



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**CÂMPUS DE BOTUCATU**



**AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS E DE  
FATORES PRÓ E ANTI-ANGIOGÊNICOS EM PLACENTA DE  
GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPسيا**

**NAILA CRISTINA VILAÇA LOURENÇO**

**Orientadora: PROFA. DRA. MARIA TEREZINHA SERRÃO PERAÇOLI**

**Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Doutor no  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Geral e Aplicada.**

**BOTUCATU - SP**  
**2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E  
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Rosemeire Aparecida Vicente*

Lourenço, Naila Cristina Vilaça.

Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores pró e anti-angiogênicos em placenta de gestantes com pré-eclâmpsia / Naila Cristina Vilaça Lourenço. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Terezinha Serrão Peraçoli  
Assunto CAPES: 20100000

1. Placenta. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Teste imunoenzimático.

CDD 574.88

Palavras-chave: Citocinas; ELISA; Fatores angiogênicos; Placenta; Pré-eclâmpsia.

*Dedico este trabalho a Deus, que sempre está presente em minha vida, ao meu amado marido Luiz C. Noronha, aos meus maravilhosos pais Nelson Serafim Lourenço e Rônia da Graças Vilaça Lourenço e aos meus queridos irmãos Guilherme Vilaça Lourenço, Airen Wormhoudt, Erika Vilaça Lourenço, José Augusto Gaspar Ruas, Gustavo Vilaça Lourenço e Mariane Melo.*

A Profa Dra Maria Terezinha Serrão Peraçoli que me aceitou como aluna e me guiou durante toda essa jornada com muito entusiasmo, paciência e sabedoria

A amiga Érika Takahashi Nakaira pela atenção, carinho e constante ajuda, a Renata Cristófaló por ter realizado parte dos experimentos da tese e a Camila Ferreira Bannwart pelo apoio e amizade

Ao Prof Dr José Peraçoli, pela seleção das gestantes com pré-eclâmpsia, pelas explicações sobre a patologia e pela ajuda na coleta e análise dos dados desse projeto

A Dra Irene Pinto Silva pelo imenso carinho e atenção sempre dispensados a mim e pela ajuda em relação às gestantes normais

Aos funcionários da seção de pós graduação do Instituto de Biociências que sempre me atenderam bem e tiraram as minhas dúvidas com paciência e bom humor

Aos residentes, enfermeiras e funcionários do Serviço de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina, aos funcionários e docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou outra tornaram possível a execução desse trabalho, meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

Resumo .....	01
Abstract .....	03
1. Introdução .....	05
2. Objetivos .....	13
3. Casuística e Métodos .....	13
3.1. Seleção das gestantes .....	13
3.2. Dosagem da proteinúria .....	15
3.3. Coleta e processamento das amostras de tecido placentário de gestantes saudáveis e portadoras de pré-eclâmpsia .....	15
3.4. Obtenção dos homogenatos placentários .....	16
3.5. Determinação das citocinas TNF-alfa, IL-10, TGF-beta1, GM-CSF, Endostatina E PIGF .....	16
3.6. Análise histopatológica da placenta .....	18
3.7. Análise estatística .....	18
4. Resultados .....	19
4.1. Características das gestantes .....	19
4.2. Concentração de citocinas e fatores placentários na placenta de gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia .....	20
4.3. Concentração de citocinas e fatores placentários na placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, classificadas segundo o critério de gravidade ....	21
4.4. Concentração de citocinas e fatores placentários na placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, classificadas segundo a idade gestacional .....	23
4.5. Análise histopatológica das placentas .....	24
5. Discussão .....	26
6. Conclusões .....	34
7. Referências bibliográficas .....	35
8. Anexo I .....	49
Ofício da Aprovação do Comitê de ética .....	50

## RESUMO

*Introdução:* A pré-eclâmpsia é uma síndrome específica da gestação humana, caracterizada por hipertensão arterial e proteinúria após a 20<sup>a</sup>. semana de gestação. É aceito que esta patologia tem origem na placenta. O fator de crescimento placentário (PIGF) tem importante papel no desenvolvimento vascular durante a invasão trofoblástica e, citocinas de perfil Th2 podem estar envolvidas na manutenção da gestação durante a interação materno-fetal. *Objetivos:* O presente trabalho avaliou a concentração de citocinas e de fatores pró e anti-angiogênicos em homogenato de placenta, obtido de gestantes normais e com pré-eclâmpsia, correlacionando esses parâmetros com a gravidade da doença e com a idade gestacional. *Métodos:* Foram estudadas 70 gestantes, sendo 30 normotensas e 40 portadoras de pré-eclâmpsia. As gestantes com pré-eclâmpsia foram classificadas de acordo com o aparecimento das manifestações clínicas em pré-eclâmpsia precoce (< 34 semanas de gestação, n=13) e pré-eclâmpsia tardia ( $\geq$  34 semanas de gestação, n=27). Um fragmento de placenta foi obtido imediatamente após o parto, homogeneizado em solução salina tamponada com fosfatos e submetido à centrifugação. O sobrenadante obtido foi empregado para determinação de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interleucina-10 (IL-10), fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta_1$ ), fator de crescimento placentário (PIGF) e Endostatina por ensaio imunoenzimático (ELISA). Outro fragmento placentário foi obtido para análise histopatológica. As diferenças entre os grupos de gestantes normais e com pré-eclâmpsia foram avaliadas por teste *t* de Student, com nível de significância de 5%. *Resultados:* Os níveis de TNF- $\alpha$ , Endostatina e GM-CSF detectados na placenta de gestantes com pré-eclâmpsia foram significativamente maiores em relação às gestantes normais. Por outro lado, as concentrações de IL-10, TGF- $\beta_1$  e PIGF foram significativamente menores nas pacientes com pré-eclâmpsia. As razões TNF/IL-10 e Endostatin/PIGF foram significativamente maiores nas gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, mostrando associação com a gravidade da doença. Os níveis de TNF- $\alpha$  e Endostatina foram elevados, enquanto os de IL-10 foram baixos em placenta de gestantes com pré-eclâmpsia precoce. As concentrações de GM-CSF, TGF- $\beta_1$  and PIGF foram semelhantes nos grupos de gestantes com pré-eclâmpsia precoce e tardia. Nas pacientes com pré-eclâmpsia precoce as lesões histopatológicas foram mais graves e freqüentes, caracterizadas pela presença de vilos hipermaduros, com aumento de nós sinciciais e

necrose fibrinóide vilosa. Nesse grupo, 84,6% das pacientes apresentaram pré-eclâmpsia grave. *Conclusões:* Os resultados mostram que altas concentrações de TNF- $\alpha$  e Endostatina e baixos níveis de IL-10 caracterizam a pré-eclâmpsia precoce. Na pré-eclâmpsia, a detecção de um desequilíbrio entre fatores pró-angiogênicos (PlGF) e anti-angiogênicos (Endostatina), bem como altos níveis de TNF- $\alpha$  e baixa concentração de IL-10 em homogenato de placenta, podem estar associados com comprometimento placentário e com a gravidade da doença.

## ABSTRACT

*Introduction:* Preeclampsia is a human pregnancy-specific syndrome characterized by the onset of hypertension and proteinuria after the 20<sup>th</sup> gestational week. It is widely accepted that this disorder is placental in origin. Placental growth factor (PlGF) plays an important role in the vascular development during trophoblast invasion and cytokines with Th2 profile may be involved in gestation maintenance and promoting a balance in maternal–fetal interaction. *Objective:* This study investigated the concentration of cytokines, angiogenic and anti-angiogenic factors in placental homogenate obtained from normotensive and preeclamptic pregnant women, and correlated these parameters with disease severity and gestational age. *Methods:* The subjects were 70 pregnant women of whom 30 were normotensive pregnant, and 40 were pregnant women with preeclampsia. The preeclamptic pregnant women were classified according to the onset of clinical manifestations in early-onset (< 34 weeks of gestation, n=13) and late-onset ( $\geq$  34 weeks of gestation, n=27) preeclampsia. A tissue fragment of the placenta was obtained immediately after delivery, homogenized with phosphate-buffered saline solution and centrifuged. Separated supernatant was employed for determination of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) Interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor beta (TGF- $\beta_1$ ), placental growth factor (PlGF), and Endostatin, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Another placental tissue segment was prepared for histopathological analysis. Differences between groups were evaluated by Student *t* unpaired test with significance set at  $p < 0.05$ . *Results:* The levels of TNF- $\alpha$ , Endostatin and GM-CSF detected in placenta of preeclamptic women were significantly increased when compared with the normotensive pregnant women. On the other hand, the concentration of IL-10, TGF- $\beta_1$  and PlGF have shown different pattern as their levels were significantly lower in patients with preeclampsia. The ratio TNF/IL-10 and endostatin/PlGF were significantly higher in preclamptic patients showing association with disease severity. TNF- $\alpha$  and Endostatin levels were higher while IL-10 were lower in placenta of preeclamptic women with early-onset preeclampsia. The concentration of GM-CSF, TGF- $\beta_1$  and PlGF were similar in both groups of early and late-onset preeclampsia. The histopathology of lesions analysis showed more frequent and severe alterations characterized by small and hypermature villi with increased syncytial knots,



fibrinoid necrosis in placenta of preeclamptic women with gestation age below 34 weeks. In this group 84,6% of the patients were classified as severe preeclampsia. *Conclusions:* The results demonstrated that high concentrations of TNF- $\alpha$  and Endostatin and low levels of IL-10 in placenta characterize the severity in patients with early-onset preeclampsia. An imbalance between angiogenic (PlGF) and anti-angiogenic (Endostatin) factors as well as higher levels of TNF- $\alpha$ , and low concentration of IL-10, may be associated with inadequate placental development in preeclampsia and with disease severity.

## 1. Introdução

Na gestação normal, durante o processo inicial do desenvolvimento da placenta e do embrião, o sistema imune materno entra em contato com antígenos fetais e, através de diferentes mecanismos de imunomodulação, desencadeia a tolerância imunológica na interface materno-fetal. Portanto, a placenta é considerada um local de tolerância, uma vez que as células imunes, presentes na decídua uterina, atuam como barreira física e imunológica, permitindo o desenvolvimento do feto e o sucesso da gestação (Kelemen et al., 1998; Peraçoli et al., 2003).

A tolerância imunológica ao semi-enxerto fetal é um mecanismo ativo, no qual os tecidos fetais não são reconhecidos como estranhos e/ou não são rejeitados pelas células do sistema imune materno (Thellin et al., 2000; Rein et al., 2003). Durante a invasão das arteríolas espiraladas por células trofoblásticas a resposta imune materna é modificada por antígenos fetais, por células imunes como monócitos, macrófagos e linfócitos, e por hormônios presentes no trofoblasto (Huddleston & Schust, 2004). O resultado é uma resposta complexa, sendo o equilíbrio entre essas interações mediado por citocinas e fatores de crescimento secretados na interface materno-fetal (Peraçoli et al., 2003).

Quando ocorre alteração ou desequilíbrio da resposta imunológica materna a tolerância imunológica não se estabelece, determinando o aparecimento de patologias obstétricas, entre as quais a pré-eclâmpsia (Peraçoli et al., 2003; Orsi & Tribe, 2008). Assim, componentes das respostas imunes, inata e adaptativa, têm papel importante na adaptação imune materna à gestação.

A pré-eclâmpsia é uma síndrome que incide entre 5% e 7% das gestações, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade, tanto materna como fetal (Walker, 2000; 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 20ª semana de gestação (Rein et al., 2003; Paternoster et al., 2004). A pré-eclâmpsia é classificada em leve e grave, de acordo com sinais e sintomas apresentados (ACOG, 2002) e, recentemente em pré-eclâmpsia precoce ou tardia, na dependência do aparecimento das manifestações clínicas antes da 34ª. ou a partir da 34ª. semana de gestação, respectivamente (von Dadelszen et al., 2003; Huppertz, 2008).

A idade gestacional não faz parte de qualquer dos critérios de classificação da pré-eclâmpsia. Porém, ela é a variável clínica mais importante na predição do resultado materno e perinatal (von Dadelszen et al., 2003). Ao mesmo tempo é importante considerar que, as manifestações clínicas e as complicações da pré-eclâmpsia ocorrem na gestação, durante o trabalho de parto e no puerpério.

Segundo Huppertz (2008), a pré-eclâmpsia de início precoce ou tardio são consideradas duas entidades que diferem quanto às suas etiologias e quanto às formas de manifestação da doença. Quando seu aparecimento é precoce, apresenta-se na forma grave, está geralmente associada com resultado anormal do Doppler da artéria uterina, fetos com restrição de crescimento intra-uterino, resultados maternos e neonatais ruins (Murphy & Stirrat, 2000; Ness & Sibai, 2006) bem como maior taxa de recorrência (Redman & Sargent, 2005). Por outro lado, a pré-eclâmpsia 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).

Segundo Moldenhauer et al. (2003), a pré-eclâmpsia de início precoce está associada com lesões isquêmicas placentárias, o que não se verifica na pré-eclâmpsia de início tardio. Assim, a pré-eclâmpsia precoce decorre de anomalia da remodelação vascular placentária, sem alterações primárias do sistema vascular materno e corresponde a um defeito da invasão das células citotrofoblásticas nas arteríolas espiraladas. Seu componente genético familiar é mais acentuado e seu prognóstico mais sombrio. Por outro lado, a pré-eclâmpsia tardia resulta da interação entre uma placenta normal e alteração inicial da rede vascular materna. Esta vasculopatia materna é favorecida por fatores de risco vascular inespecíficos como diabete, idade, hipertensão arterial e índice de massa corpóreo aumentado. Representa um obstáculo ao desenvolvimento da vascularização, observado fisiologicamente no final da gestação, em resposta a importantes necessidades hemodinâmicas fetoplacentárias (Boulangier & Flamant, 2007).

Embora a pré-eclâmpsia seja uma doença ainda sem etiologia estabelecida, está demonstrado 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, como: placentação inadequada (Pijnenborg et al., 1983), 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),

resposta inflamatória excessiva (Redman et al., 1999; Kharfi et al., 2003; Redman & Sargent, 2003), trombose e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Elsheikh et al., 2001).

Entre as evidências que dão suporte à hipótese da má adaptação imunológica e inadequada tolerância materna ao feto merecem destaque a alta incidência de pré-eclâmpsia em mulheres que engravidam após doação de óvulos ou por inseminação artificial com espermatozoides de outro doador que não o parceiro e em mulheres que estão em sua primeira gestação ou cuja gestação ocorre após troca de parceiro, uma vez que, em todas essas situações o sistema imune se depara com novos antígenos e desenvolve resposta inflamatória contra os mesmos (Dekker, 2002; Feinberg, 2006).

Em vigência de hipoxia, a placenta de mulheres com pré-eclâmpsia manifesta intenso estresse oxidativo (Burton & Jauniaux, 2004; Myatt & Cui, 2004), resultante de lesão causada por hipoxia e reperfusão (Hung & Burton, 2006) e/ou deficiência das defesas antioxidantes (Perkins, 2006). Por outro lado, nessa doença o aumento do estresse oxidativo é um achado sistêmico (Roberts & Hubel, 1999), representado pela liberação de mediadores da disfunção da célula endotelial como peróxidos lipídicos (Walsh, 1998), citocinas pró-inflamatórias (Hung et al., 2004; Matthiesen et al., 2005) e micropartículas liberadas pelo sinciciotrofoblasto (Redman & Sargent, 2000; Schmidt et al., 2008).

Dessa forma, o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Kharb et al., 2000; Takagi et al., 2004), na qual atua de maneira sistêmica, causando lesão do endotélio, fenômeno diretamente relacionado com a doença (Rein et al., 2003). Assim, é observado aumento da concentração plasmática de radicais livres, que antecede o aparecimento das manifestações clínicas da doença e apresenta correlação significativa com os valores de pressão arterial (Wickens et al., 1981; Erskine et al., 1985).

Células imunes, particularmente os macrófagos e linfócitos, são a principal fonte de citocinas e fatores de crescimento, contribuindo para a manutenção do equilíbrio entre as células linfocíticas e as citocinas presentes na placenta. A detecção de intensa infiltração dessas células na interface materno-fetal sugere que estejam envolvidas em funções específicas associadas à gravidez e não somente na resposta imune (Abrahams et al., 2004).

As citocinas são polipeptídeos de 8 a 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 (Abbas et al., 2008). 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, 2008). A rede de citocinas envolvidas nos processos relacionados à gestação é complexa, uma vez que podem influenciar mecanismos envolvidos na implantação do ovo, na evolução da gestação e no mecanismo do parto. As interações sinérgicas entre as citocinas são dinâmicas e moduladas pelos hormônios relacionados à gravidez. Quando se alteram podem estar associadas com complicações como abortamento, pré-eclâmpsia e parto prematuro (Orsi & Tribe, 2008).

A literatura mostra que na pré-eclâmpsia existe ativação de resposta imune mediada por células T, que produzem citocinas de perfil Th1 como Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), Interleucina-2 (IL-2) e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), tanto no sangue periférico como na interface materno-fetal (Darmochwal-Kolarz, 1999; Saito & Sakai, 2003). Esses linfócitos T estão ativados e relacionados ao mecanismo inadequado de tolerância materna, presente nessa patologia. Portanto, na pré-eclâmpsia o perfil de citocinas predominante é do tipo Th1, que causa ativação de macrófagos, indução de reações citotóxicas e inflamatórias, em detrimento do perfil tipo Th2, relacionado à secreção de citocinas com atividade anti-inflamatória e reguladora, como IL-10 e fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ), que caracteriza o perfil imunológico da gestação normal (Saito et al., 2007).

Assim, na dependência do tipo de citocina envolvida (perfil Th1 ou Th2), da concentração da mesma e do tempo de secreção em relação ao tecido alvo, as reações desencadeadas podem estar relacionadas com a fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Kupferminc et al., 1994, 1994a; Vince et al., 1995; Raghupathy & Kalinka, 2008).

Na gestação normal a IL-10 influencia a atividade do trofoblasto placentário, exerce efeito supressor sobre as células *natural killer* (NK), sobre a produção autócrina do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) pelos monócitos e regula a imunoproteção fetal (Rein et al., 2003). O TGF- $\beta_1$  regula a diferenciação do trofoblasto e a transformação das artérias espiraladas, sendo extremamente importante na manutenção da gestação (Ayatollahi, et al., 2005; Daher et al., 2006).

A IL-10 e o TGF- $\beta_1$  são consideradas citocinas de referência para o sucesso gestacional por apresentarem efeito regulador sobre a resposta imune, inibir padrão de resposta tipo Th1 e, em baixas concentrações estarem relacionadas a abortos espontâneos e

pré-eclâmpsia (Moore et al., 2001; Rein et al., 2003; Jonsson et al., 2005; Makris et al. 2006; Sharma et al., 2007). Porém, segundo a literatura, a relação de TGF- $\beta$  e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia é controversa. Apesar do reconhecimento de seu papel no processo de placentação (Huber et al., 2002; Nagaeva et al., 2002; Daher et al., 2006), vários autores relatam que altos níveis dessa citocina podem estar envolvidos na patogênese da pré-eclâmpsia (Madazli et al., 2003; Muy-Rivera et al., 2004; Stanczuk et al., 2007; Peraçoli et al., 2008).

Os tecidos placentários também expressam citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , potentes ativadores do endotélio vascular e prováveis mediadores da disfunção endotelial na pré-eclâmpsia (Rein et al., 2003). Na gestação normal o TNF- $\alpha$  modula o crescimento trofoblástico e a invasão trofoblástica das arteríolas espiraladas, porém em excesso, pode restringir essa invasão, contribuindo com a fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Peraçoli et al., 2007).

O fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) parece estar relacionado com a formação da placenta, pois receptores para GM-CSF foram encontrados em vilos do citotrofoblasto no primeiro trimestre de gestação (Jokhi et al., 1994; Robertson et al., 2007). Curry et al. (2008) observaram queda na concentração de GM-CSF quando compararam os estágios iniciais da gestação (média de 8,5 semanas) com o segundo trimestre (média de 25 semanas).

O epitélio uterino é importante fonte de GM-CSF, como pode ser 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 hipoxia placentária, que precede o desenvolvimento de pré-eclâmpsia (Hayashi et al. 2003).

Além de estar associado com ativação da resposta inflamatória pelo sistema imune, o desenvolvimento da pré-eclâmpsia está relacionado com a falha da invasão das células trofoblásticas nas arteríolas espiraladas durante a implantação e desenvolvimento inicial do embrião (Rein et al., 2003), com aumento da apoptose das células trofoblásticas e com isquemia placentária (Tjoa et al., 2004). 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 hipoxia/isquemia placentária (Amash et al., 2007; Gilbert et al., 2008).

Kingdom & Kaufmann (1997), analisando vilos placentários de gestantes portadoras de complicações, classificaram a hipoxia fetal, quanto à sua origem, em pré-placentária, útero-placentária e pós-placentária. Na hipoxia pré-placentária, a concentração de oxigênio do sangue materno que chega no espaço intervilo é baixa, com risco de causar hipoxia para mãe, placenta e feto. Na hipoxia útero-placentária, o teor de oxigênio do sangue materno é normal mas o fluxo no interior do espaço intervilo é heterogêneo e localmente comprometido. Portanto, os vilos placentários ficam expostos a suprimento heterogêneo de oxigênio. A hipoxia pós-placentária também é caracterizada por concentração materna adequada de oxigênio associada com fluxo normal ou reduzido de sangue no espaço intervilo. Entretanto, a perfusão vascular fetal, e como consequência, a extração de oxigênio da placenta pelo feto estão diminuídas. Como resultado, o feto está em situação de hipoxia e a placenta pode ter concentrações de oxigênio acima do normal. Segundo Mayhew et al. (2004), diferentes situações representam essa classificação da hipoxia fetal. Altitude elevada e anemia materna favorecem a hipoxia pré-placentária, pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal intra-útero com manutenção do fluxo diastólico nas artérias umbilicais representam a hipoxia útero-placentária e, restrição de crescimento fetal intra-útero com diástole zero ou reversa nas artérias umbilicais está associada com hipoxia pós-placentária.

Na pré-eclâmpsia, a hipoxia é classificada como útero-placentária, associando-se com isquemia, uma vez que o aporte sanguíneo materno está comprometido, não irrigando de maneira adequada o espaço intervilo. Isso é o resultado de eventos ocorridos nos estágios iniciais da gestação, que determinaram invasão deficiente do trofoblasto nas artérias espiraladas. Assim, os vilos estão expostos a quantidades desiguais de perfusão sanguínea e oxigenação, o que pode comprometer o trofoblasto e o endotélio vascular (Mayhew et al., 2004a). Essa isquemia placentária promove a liberação de fatores na circulação materna, que iniciam uma cascata de eventos celulares e moleculares, causando a disfunção endotelial e vascular, que resulta nas características clínicas da doença, isto é, hipertensão e proteinúria (Amash et al., 2007).

O processo de invasão das arteríolas espiraladas pelo trofoblasto extraviloso, tanto em roedores (Rossant & Cross, 2001) como em primatas (Ghosh et al., 2000) parece ser controlado por genes, que codificam fatores angiogênicos de atuação local como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento placentário (PlGF). Esses genes são regulados por citocinas, tensão de oxigênio e estímulos mecânicos (Kingdom & Kaufmann, 1997; Damsky & Fisher, 1998).

O PIGF é uma glicoproteína de 45 a 50 kDa, membro da família do VEGF, que exerce atividade angiogênica *in vivo* (Persico et al. 1999; Okamoto et al., 2003). É produzido por vários tipos de células e tecidos, incluindo-se o trofoblasto placentário e o endotélio materno (Vatten et al., 2007). A expressão de PIGF na placenta humana predomina na camada do sinciciotrofoblasto, que está em contato direto com a circulação materna (Persico et al., 1999). No soro de gestantes normais a concentração de PIGF é baixa no primeiro trimestre (7 a 15 semanas de gestação), aumenta gradativamente e atinge o valor máximo entre 28 e 30 semanas, e a partir deste período se reduz até o final da gestação (Torry et al., 1998). O déficit de produção pode resultar em vascularização anômala, uma vez que essa glicoproteína exerce papel importante no desenvolvimento vascular durante a invasão trofoblástica (Tsatsaris et al., 2003).

A diminuição de PIGF circulante pode estar relacionada com menor produção de fatores de crescimento angiogênicos e assim ser uma das causas da deficiência da vascularização placentária na pré-eclâmpsia (Taylor et al, 2003; Dimitrakova et al., 2004), uma vez que alterações em sua concentração podem representar desenvolvimento placentário anormal (Masuyama et al., 2006).

Duas proteínas anti-angiogênicas de origem placentária e presentes na circulação na forma solúvel, a tirosina-quinase 1 *fms-like* (sFlt-1) e a Endoglina, tem sido valorizadas na patogênese da pré-eclâmpsia (Ito et al., 2002; Maynard et al., 2003; Venkatesha et al., 2006). Na circulação sanguínea, a sFlt-1 atua como potente antagonista do VEGF. Tanto VEGF como PIGF são produzidos pela placenta e circulam em altas concentrações durante a gestação. No soro de mulheres que desenvolvem pré-eclâmpsia as concentrações de sFlt-1 estão aumentadas, enquanto as de PIGF estão diminuídas, mesmo antes do aparecimento dos sintomas e sinais clínicos (Levine et al., 2004; Buhimschi et al., 2005). A forma solúvel do receptor para VEGF (sFlt-1) é produzida pela placenta sob condições de hipoxia (Kita & Mitsushita, 2008) e está aumentada tanto no soro como na placenta de pacientes com pré-eclâmpsia (Ahmad & Ahmed, 2001; Koga et al., 2003; Levine et al., 2004). Atua sequestrando PIGF e VEGF livres produzidos nos tecidos placentários e impedindo a interação entre esses fatores e seus receptores na célula endotelial, causando disfunção endotelial (Nakatsukasa et al., 2008). Assim, altos níveis de sFlt-1 induzem deficiência na angiogênese da placenta, desempenhando importante papel na patogênese da pré-eclâmpsia (Ahmad & Ahmed, 2004; Rajakumar et al., 2009). A Endoglina atua como co-receptor de TGF- $\beta$ , uma potente molécula angiogênica. Está expressa na superfície de células endoteliais e do sinciciotrofoblasto. Em placentas de gestantes pré-eclâmpicas observa-se



aumento da expressão de mRNA para Endogлина. Além disso, a região extracelular da molécula de Endogлина é clivada proteoliticamente e a Endogлина solúvel é liberada em grande quantidade na circulação, determinando piora da lesão vascular mediada pela sFlt-1, resultando em maior gravidade da pré-eclâmpsia (Venkatesha et al., 2006). Estudos mostram aumento da concentração de Endogлина solúvel antes do aparecimento dos sintomas de pré-eclâmpsia (Levine et al., 2006).

É descrito que, durante a gestação normal, níveis fisiológicos de VEGF e TGF- $\beta$ 1 são responsáveis pela manutenção do relaxamento vascular em diferentes tecidos, por meio de interação com seus respectivos receptores sFlt-1 e Endogлина, presentes no endotélio. Na pré-eclâmpsia, a produção excessiva dos fatores anti-angiogênicos sFlt-1 e Endogлина solúveis causa disfunção endotelial por inibir a sinalização de VEGF e TGF- $\beta$ 1 nos vasos (Lam et al., 2005; Maynard et al., 2008).

Vatten et al. (2007) sugerem que, nos estágios iniciais da gestação, baixas concentrações de PlGF aumentam o risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia, pois verificaram que a hipoxia placentária desencadeia a produção e liberação de sFlt-1 para a circulação materna, que se liga ao VEGF e PlGF, removendo-os da circulação. Esse processo priva o endotélio vascular de fatores angiogênicos, inibindo a vasodilatação e induzindo a disfunção endotelial.

Na pré-eclâmpsia, o estado de hipoxia também determina a produção de outros fatores anti-angiogênicos, entre eles a Endostatina, um potente inibidor endógeno de angiogênese e crescimento de células endoteliais e tumorais. Esse fator é um fragmento C-terminal da matriz protéica extracelular do colágeno XVIII, (Mayhew et al., 2004; Digtyar et al., 2007; Aref et al., 2008), que em concentrações elevadas pode atuar como inibidor da angiogênese em gestantes com pré-eclâmpsia e assim participar da fisiopatologia da mesma, pois inibe o crescimento das células endoteliais e neutraliza os efeitos do VEGF (Hirtenlehner et al., 2003).

Assim, a pré-eclâmpsia é identificada como uma doença complexa e multifatorial, que em sua fisiopatologia envolve uma resposta inflamatória descontrolada do sistema imune materno contra os antígenos fetais e a alteração endotelial vascular materna, que resulta em hipoxia e isquemia (Dekker, 2005).

A presente pesquisa se propôs a investigar, em homogenatos placentários de mulheres portadoras de pré-eclâmpsia, a presença de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e GM-CSF) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ), e de fatores angiogênicos (PlGF e

Endostina), na tentativa de contribuir para a melhor compreensão das alterações placentárias presentes nessa doença, uma vez que existem indícios de que na pré-eclâmpsia a placenta não é um local de tolerância imune, mas de desenvolvimento de resposta inflamatória de rejeição tardia contra o feto.

## **2. Objetivos**

2.1. Determinar as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e GM-CSF) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta_1$ ) e de fatores pró-angiogênicos (PIGF) e anti-angiogênicos (Endostatina) em placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

2.2. Analisar a histopatologia das lesões em placenta de gestantes com pré-eclâmpsia, classificadas quanto à idade gestacional do aparecimento das manifestações clínicas (precoce ou tardia).

2.3. Relacionar as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias e de fatores pró e anti-angiogênicos em placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia com a classificação da doença, segundo a gravidade e a idade gestacional de aparecimento das manifestações clínicas (precoce ou tardia).

## **3. Casuística e Métodos**

### **3.1. Seleção das gestantes**

Foram estudadas 30 gestantes normais e 40 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, atendidas no Serviço de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. O tamanho amostral foi calculado com base em trabalho anterior (Peraçoli et al., 2007), em que os valores de média e desvio padrão da citocina TNF-alfa, em gestantes normais, foram 99,99pg/mL e 8,42pg/mL, respectivamente. Considerando como resultado alterado o valor de pelo menos a média mais um desvio padrão, com nível de significância de 5% e poder de 5%, o tamanho amostral foi de 26 gestantes em cada grupo (controle e estudo). Para o caso de eventuais perdas optou-se por incluir no estudo pelo menos 30 gestantes em cada grupo.

As gestantes portadoras de pré-eclâmpsia foram estratificadas, segundo Huppertz (2008), em dois grupos, de acordo com a idade gestacional no momento do diagnóstico da doença: menor que 34 semanas (pré-eclâmpsia precoce) e igual ou maior que 34 semanas (pré-eclâmpsia tardia).

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

Uma gestante foi considerada portadora de pré-eclâmpsia quando, sem antecedente de hipertensão arterial, manifestou hipertensão arterial ( $\geq 140 \times 90$  mmHg) associada à proteinúria ( $\geq 300$  mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20ª semana de gestação (NHBPEP, 2000).

A pré-eclâmpsia foi classificada em leve ou grave, conforme a ausência ou presença, respectivamente, de algum dos critérios abaixo (NHBPEP, 2000):

- valor de pressão arterial de pelo menos  $160 \times 110$  mmHg, confirmado em duas medidas, com intervalo de quatro horas;
- valor de proteinúria de pelo menos 2g em urina de 24 horas;
- sintomas de eclâmpsia iminente: alterações clínicas do sistema nervoso central (cefaléia, obnubilação, torpor, alteração de comportamento), visuais (escotomas, fosfenas, turvação da visão) e gástricas (dor epigástrica ou no hipocôndrio direito, náuseas, vômitos).
- eclâmpsia: manifestação de crise convulsiva e/ou coma, na ausência de patologia do sistema nervoso central;
- síndrome HELLP: presença de hemólise (esquizócitos em esfregaço de sangue periférico, anemia ou bilirrubina total acima de 1,2mg%), elevação de enzimas hepáticas (TGO  $\geq 70$  UI/L e/ou desidrogenase láctica  $\geq 600$  UI/L) e plaquetopenia (contagem inferior a 100.000 por  $\text{mm}^3$ );
- oligúria: diurese menor que 500ml em 24 horas);
- cianose;
- edema agudo de pulmão;
- restrição de crescimento intra-uterino.

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento esclarecido. O projeto de

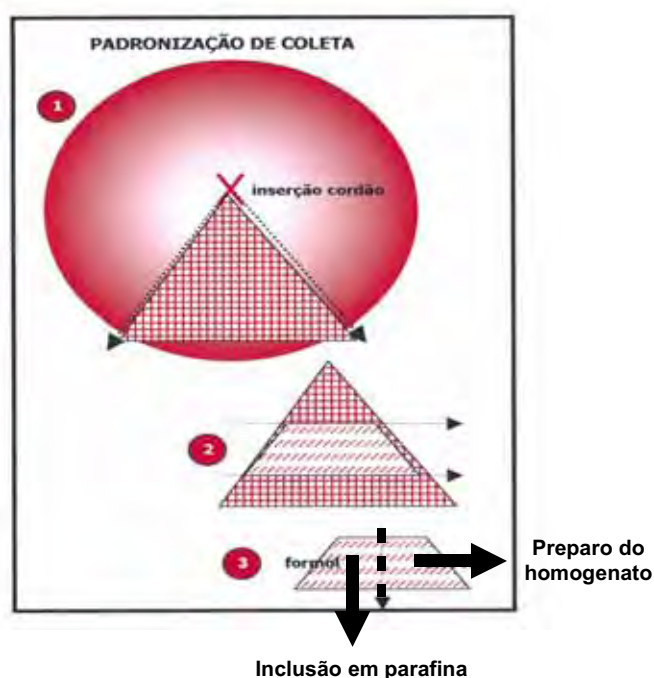
pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, protocolo no. 151/2006 (anexo 1).

### 3.2. 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.

### 3.3. Coleta e processamento das amostras de tecido placentário de gestantes saudáveis e portadoras de pré-eclâmpsia

A amostra de tecido placentário, abrangendo a faces materna e fetal, foi colhida a partir do centro da placenta, em forma de triângulo, com auxílio de um bisturi cirúrgico logo após a extração da mesma. O fragmento placentário obtido foi imediatamente colocado em recipiente estéril, contendo solução salina para transporte até o laboratório. Esse fragmento foi recortado e subdividido em duas partes iguais, conforme representado na Figura 1. Um dos fragmentos foi envolto em papel alumínio e após identificação foi mergulhado em nitrogênio líquido para rápido congelamento. A seguir foi armazenado a -80°C até o momento da preparação do homogenato. O outro fragmento foi processado para análise histológica.



**Figura 1.** Representação da coleta do fragmento placentário (Calderon et al., 2007).

### **3.4. Obtenção dos homogenatos placentários**

Após o descongelamento, a amostra do tecido placentário foi pesada, sendo anotado o valor em gramas. Em seguida a amostra foi seccionada em fragmentos menores com auxílio de bisturi, que foram transferidos para o recipiente do homogenizador de tecidos, contendo 10mL do tampão com inibidor de proteases: 150mM/L NaCl e 20 mM/L Tris pH 7,5, 5mM/L EDTA e 1 mM/L phenilmethylsulfonil fluoreto, pH 7.3). Após a homogeneização, em banho de gelo, o material foi acondicionado em tubos de ensaio e centrifugado a 3500rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi aliqotado em microtubos de 0,5mL, previamente identificados e as alíquotas armazenadas a -80°C até o momento da determinação das citocinas e dos fatores placentários.

### **3.5. Determinação das citocinas TNF-alfa, IL-10, TGF-beta1, GM-CSF, Endostatina e PIGF**

Para quantificação das citocinas e dos fatores placentários nos homogenatos de placenta obtidos de gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia, empregou-se ensaio imunoenzimático (ELISA) e kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA ou Biolegend, San Diego, CA, USA). As reações foram desenvolvidas segundo as instruções dos fabricantes.

As placas de 96 orifícios e fundo plano (MaxiSorp-Nunc Life Tech. Inc., Maryland, MA, USA) foram sensibilizadas por 18h a 4°C com anticorpo monoclonal anti-citocina, diluído em PBS. Após esse período, os orifícios foram lavados quatro vezes com 300µL de PBS, pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). O bloqueio da placa foi realizado por adição de 300µL de PBS contendo 1% de soro albumina bovina (BSA) em cada orifício e incubação à temperatura ambiente por 60 min. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100µL dos homogenatos de placenta e das citocinas recombinantes (R&D Systems) foram adicionados aos orifícios das placas. Após 2h de incubação à temperatura ambiente e nova lavagem da placa, o anticorpo revelador policlonal anti-citocina (R&D Systems) foi adicionado, seguido de incubação por 2h à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionados 100µL de estreptoavidina conjugada com peroxidase (R&D Systems), na concentração de 2µg/mL por 20 min a 37°C, seguido pela lavagem da placa com PBST. Após esse período, adicionaram-se 100µL do substrato enzimático, constituído por 10µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (Sigma), diluídos em 12,5mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e 1mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma). As

placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min, a reação foi bloqueada pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland) com comprimento de onda de 492nm. As concentrações das citocinas presentes nos homogenatos foram calculadas sobre curvas padrão realizadas com as diferentes citocinas recombinantes humanas.

O valor das concentrações das citocinas e dos fatores placentários, obtido em pg/mL, foi dividido pelo peso da amostra placentária, ajustado para g/mL e a concentração final das citocinas expressa em pg/g/mL de tecido placentário.

Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonal e policlonal, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas padrão, foram aquelas recomendadas pelos fabricantes (R & D Systems e Biolegend) e descritas no quadro abaixo.

**Quadro 1.** Concentrações de citocinas e fatores placentários recombinantes, empregados nas curvas padrão e dos anticorpos monoclonais e policlonais utilizados na técnica de ELISA.

Citocina	Citocina recombinante (curva padrão)	Anticorpo monoclonal	Anticorpo policlonal
TNF- $\alpha$ *	3,9 - 500 pg/mL	4 ug/mL	75 ng/mL
IL-10 <sup>+</sup>	2 - 300 pg/mL	2 ug/mL	200 ng/mL
TGF- $\beta_1$ #	15 – 1000 pg/mL	2 ug/mL	300 ng/mL
GM-CSF •	0,5 – 300 pg/mL	2 ug/mL	500 ng/mL
PIGF •	3,9 – 500 pg/mL	4 ug/mL	60 ng/mL
Endostatina <sup>o</sup>	0,31 – 200 pg/mL	4 ug/mL	100 ng/mL

\* Human TNF- $\alpha$  ELISA Max Set Deluxe (Biolegend, San Diego, CA, USA)

<sup>+</sup> Human IL-10 ELISA Max Set Deluxe (Biolegend, San Diego, CA, USA)

# Human TGF-beta<sub>1</sub> Duo Set (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

• Human GM-CSF Immunoassay Quantikine High Sensitivity (R&D Systems, MN, USA).

• Human PIGF Duo Set (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

<sup>o</sup> Human Endostatine Immunoassay, Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

### **3.6. Análise histopatológica da placenta**

Após realizada a coleta, o material placentário foi fixado em formalina tamponada a 10% por 48 horas e submetido a processo de lavagem em água corrente por 24 horas. Os fragmentos de placenta foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em parafina. Os cortes histológicos de 5µm de espessura foram colocados sobre lâmina histológica para coloração pelo método de Hematoxilina - Eosina (HE).

### **3.7. Análise Estatística**

A comparação entre os resultados obtidos da determinação de citocinas e fatores placentários nos homogenatos de placenta de gestantes normais e com pré-eclâmpsia foi realizada empregando-se o teste *t* de Student, para amostras independentes. O mesmo teste foi utilizado para a comparação desses parâmetros quando as pacientes portadoras de pré-eclâmpsia foram classificadas quanto à idade gestacional (menor que 34 semanas e igual ou maior que 34 semanas) e quanto à gravidade da pré-eclâmpsia (Leve ou Grave). Na análise da relação TNF/IL-10 e Endostatina/PIGF obtida de gestantes normais e com pré-eclâmpsia, classificadas quanto à gravidade, foi utilizada análise de variância para amostras independentes (ANOVA). Todas as análises foram realizadas empregando-se o programa estatístico INSTAT (Graph-Pad, San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

## 4. Resultados

### 4.1. Características das gestantes

As características das gestantes estudadas encontram-se na Tabela 1, onde as gestantes foram estratificadas em normais e portadoras de pré-eclâmpsia e quanto à idade gestacional no momento do diagnóstico (<34 semanas – pré-eclâmpsia precoce e ≥34 semanas – pré-eclâmpsia tardia).

Nos dois critérios de estratificação das gestantes a idade materna foi semelhante entre os grupos analisados. As gestantes com pré-eclâmpsia precoce apresentaram maior concentração de proteinúria (4.160mg/24 horas) que aquelas com pré-eclâmpsia tardia (495mg/24 horas), assim como apresentaram maior percentagem (84,6%) de casos graves que aquelas com pré-eclâmpsia tardia (37,0%).

**Tabela 1.** Características das gestantes estudadas.

Características	Gestantes		Idade gestacional		
	Normais n=30	Pré-eclâmpsia n=40	< 34 semanas n=13	≥ 34 semanas n=27	
Idade (anos)	26 (15 – 37)	25 (16 – 39)	25 (17 – 39)	24 (16 – 36)	
Idade gestacional (semanas)	38 (37 – 41)	36 (24 – 40)	31 (24 – 33)	38 (34 – 40)	
Proteinúria (mg/24 horas)	-----	860 (300 – 20.910)	4.160 (330 – 16.580)	495 (300 - 20.910)	
Gravidade	Leve	-----	47,5	15,4	63,0
	Grave	-----	52,5	84,6	37,0

Os valores de idade materna, idade gestacional e proteinúria estão expressos em mediana, e os valores da gravidade da pré-eclâmpsia expressos em percentagem.



#### 4.2. Concentração de citocinas e fatores placentários na placenta de gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia

Na Tabela 2 estão representadas as concentrações das citocinas, pró e anti-inflamatórias, bem como dos fatores angiogênicos e anti-angiogênicos detectados no homogenato de placenta de gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia. Os níveis de TNF- $\alpha$  e GM-CSF foram significativamente maiores nas placentas de gestantes com pré-eclâmpsia. Por outro lado, a concentração das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta_1$  foram significativamente menores em comparação com as gestantes normais. Em relação aos fatores placentários, os níveis de Endostatina foram significativamente maiores em gestantes com pré-eclâmpsia, enquanto a concentração de PIGF foi significativamente menor nessas pacientes em comparação com as gestantes normais.

**Tabela 2.** Níveis placentários de TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-10, TGF- $\beta_1$ , PIGF e Endostatina em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e gestantes normais.

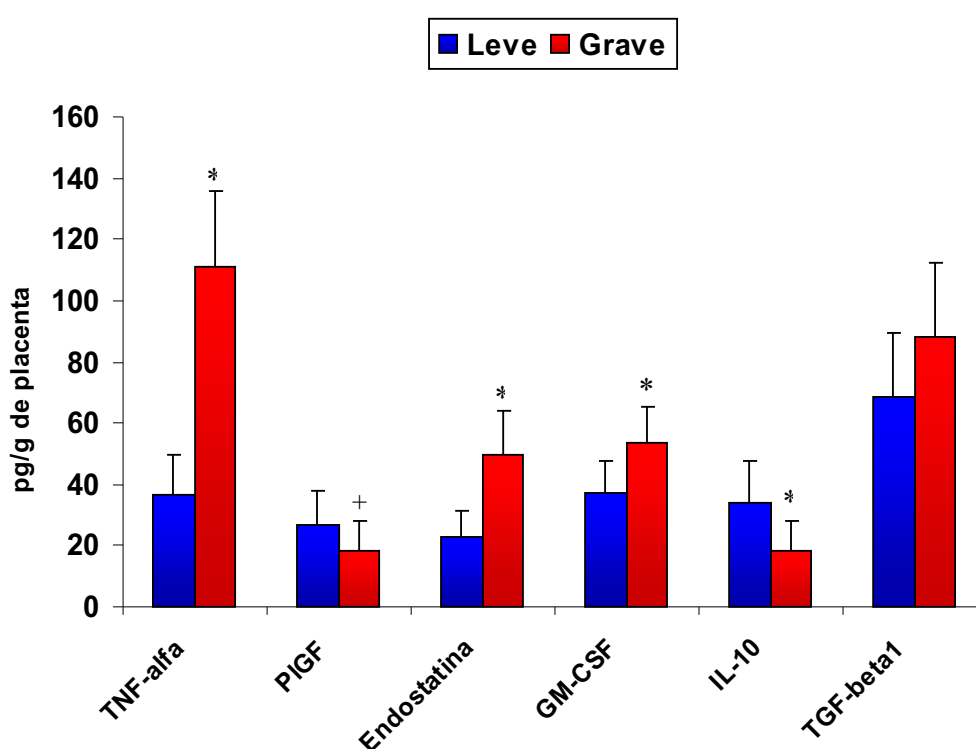
Citocinas e fatores placentários	Gestantes		Significância *
	Pré-eclâmpsia n=40	Normais n=30	
TNF- $\alpha$	72,6 $\pm$ 7,5	34,3 $\pm$ 8,2	p < 0,001
GM-CSF	46,2 $\pm$ 13,4	23,4 $\pm$ 7,7	p < 0,001
IL-10	25,4 $\pm$ 11,3	75,9 $\pm$ 16,7	p < 0,001
TGF- $\beta_1$	77,2 $\pm$ 25,2	225,9 $\pm$ 38,5	p < 0,001
PIGF	25,1 $\pm$ 10,4	94,5 $\pm$ 23,9	p < 0,001
Endostatina	38,8 $\pm$ 11,3	15,9 $\pm$ 5,2	p < 0,001

Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de pg/g de tecido placentário.

\*Teste *t de Student*

### 4.3. Concentração de citocinas e fatores placentários na placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, classificadas segundo o critério de gravidade

A gravidade da pré-eclâmpsia foi classificada em Leve (L) ou Grave (G) com base nos critérios do NHBPEP (2000). Na Figura 2 estão representadas as concentrações das citocinas e fatores placentários detectados na placenta de gestantes com pré-eclâmpsia leve ou grave. As concentrações de TNF- $\alpha$ , Endostatina e GM-CSF foram significativamente maiores nas formas graves, enquanto as de IL-10 e PlGF foram significativamente menores em relação às formas leves da doença.

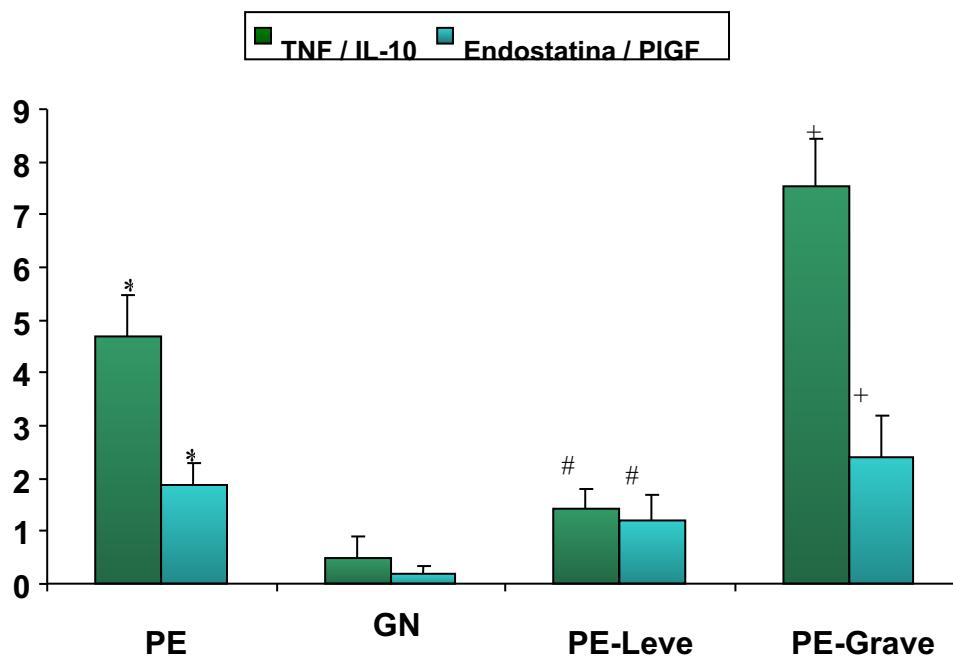


**Figura 2.** Concentração de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e GM-CSF) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ <sub>1</sub>), e dos fatores de crescimento placentário (PlGF) e inibidor da angiogênese (Endostatina) de acordo com a gravidade de pré-eclâmpsia. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de pg/g de tecido placentário de 19 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia leve (Leve) e 21 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia grave (Grave).

\* (p < 0,001); + (p < 0,05) Grave *versus* Leve (Student *t* test)

A relação entre os valores de TNF- $\alpha$  e IL-10 e entre os de Endostatina e PIGF, detectados na placenta de gestantes normais e com pré-eclâmpsia, estão representados na Figura 3. A relação TNF- $\alpha$ /IL-10 foi significativamente maior nas placentas das gestantes com pré-eclâmpsia ( $4,7 \pm 0,8$ ) em relação às gestantes normais ( $0,5 \pm 0,1$ ). Resultado semelhante foi observado quanto à relação Endostatina/PIGF. Valores significativamente mais elevados foram observados nas placentas de pacientes com pré-eclâmpsia ( $1,9 \pm 0,2$ ) quando comparados às gestantes normais ( $0,2 \pm 0,02$ ).

A classificação das gestantes portadoras de pré-eclâmpsia com relação à gravidade da doença mostrou que nas formas graves as relações TNF- $\alpha$ /IL-10 ( $7,5 \pm 2,9$ ) e Endostatina/PIGF ( $2,4 \pm 0,9$ ) foram significativamente maiores do que nas formas leves ( $1,4 \pm 0,3$ ) e ( $1,2 \pm 0,2$ ) respectivamente.



**Figura 3.** Relação entre os níveis de TNF- $\alpha$ /IL-10 e Endostatina/PIGF detectada em homogenato de placenta de gestantes normais (n=30) e com pré-eclâmpsia (n=40), e nas gestantes portadoras de pré-eclâmpsia classificadas quanto à gravidade da doença em Leve (n=19) ou grave (n=21).

\* ( $p < 0,001$ ) versus GN; # ( $p < 0,01$ ) versus GN; + ( $p < 0,001$ ) versus PE-Leve (Anova)

#### 4.4. Concentração de citocinas e fatores placentários na placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, classificadas segundo a idade gestacional

As gestantes portadoras de pré-eclâmpsia foram estratificadas em dois grupos, segundo a idade gestacional, no momento do diagnóstico da doença: menor que 34 semanas (precoce) e igual ou maior que 34 semanas (tardia). Na Tabela 4 podem ser observados os resultados de citocinas e fatores placentários obtidos nos homogenatos de placenta.

**Tabela 3.** Níveis placentários de TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-10, TGF- $\beta_1$ , PIGF e Endostatina em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia distribuídas quanto à idade gestacional no momento da resolução da gestação.

Citocinas e fatores placentários	Idade gestacional		Significância *
	< 34 semanas n=13	$\geq$ 34 semanas n=27	
TNF- $\alpha$	103,9 $\pm$ 21,8	58,7 $\pm$ 14,2	p < 0,01
GM-CSF	48,1 $\pm$ 13,0	45,1 $\pm$ 13,8	p = 0,5605
IL-10	17,4 $\pm$ 7,1	31,9 $\pm$ 8,7	p < 0,01
TGF- $\beta_1$	84,3 $\pm$ 16,2	64,9 $\pm$ 18,1	p = 0,2927
PIGF	28,9 $\pm$ 9,4	24,8 $\pm$ 13,8	p = 0,3738
<b>Endostatina</b>	<b>44,8 <math>\pm</math> 11,3</b>	<b>34,9 <math>\pm</math> 12,2</b>	<b>p &lt; 0,05</b>

Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de pg/g de tecido placentário.

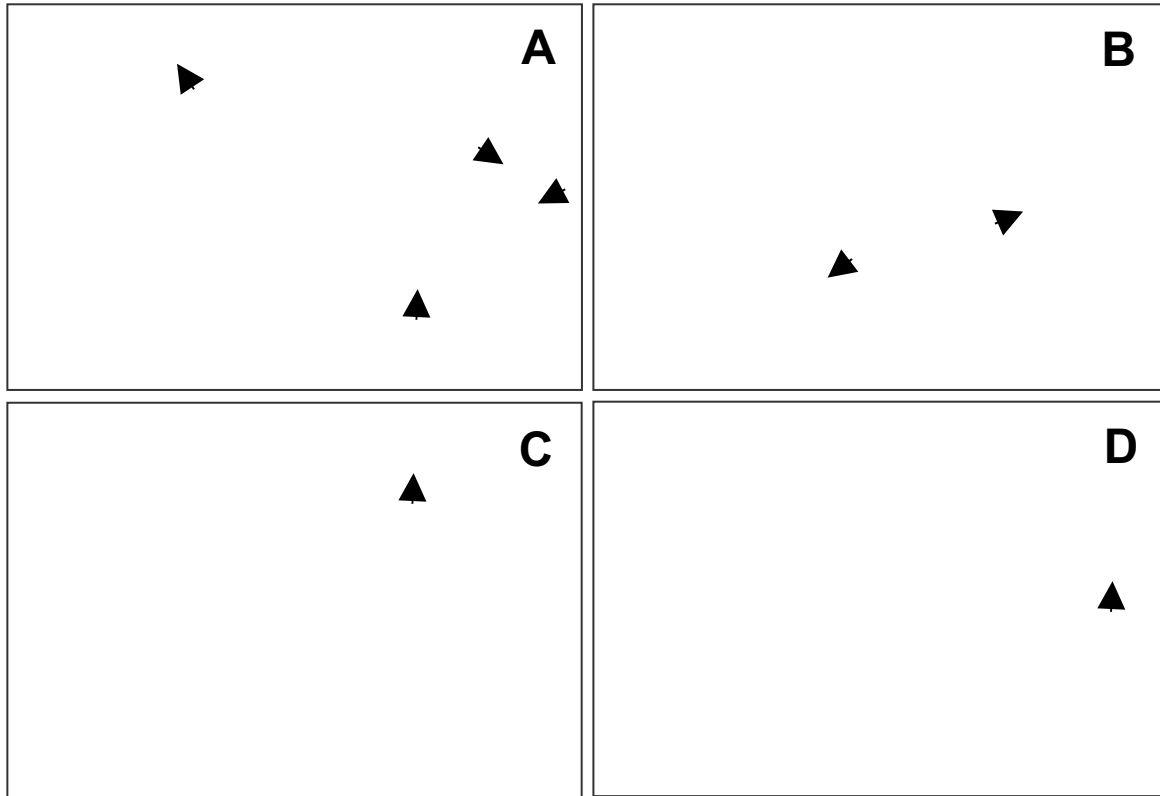
\*Teste *t de Student*

Os resultados mostram que placentas de gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia precoce (<34 semanas) apresentam concentrações de TNF- $\alpha$  e de Endostatina significativamente maiores e níveis de IL-10 significativamente menores em relação às placentas obtidas de gestantes com pré-eclâmpsia tardia ( $\geq$ 34 semanas). As concentrações

de GM-CSF, TGF- $\beta_1$  e PIGF foram semelhantes nos dois grupos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

#### **4.5. Análise Histopatológica das Placentas**

O exame histopatológico das placentas de gestantes com pré-eclâmpsia mostrou alterações histopatológicas compatíveis com amadurecimento precoce das mesmas, representado pela maior presença de nós sinciciais, aspecto fibroso do estroma vilositário, áreas de infarto, necrose fibrinóide e presença de fibrina perivilosa. Essas alterações foram observadas predominantemente nas placentas com idade gestacional inferior a 34 semanas. No grupo de placentas com idade gestacional maior ou igual a 34 semanas e inferior a 37 semanas, as alterações foram restritas a um discreto amadurecimento precoce, com discreto aumento do número de nós sinciciais para a idade gestacional e discreta fibrose vilositária. As placentas de gestações com idade superior a 37 semanas apresentaram-se dentro do padrão histológico de normalidade, assim como no grupo controle de gestantes normais (Figura 4).



**Figura 4.** A) Vilosidades de gestação de 28 semanas com pré-eclâmpsia, mostrando amadurecimento precoce evidenciado pelo aumento de nós sinciciais (setas) e aspecto fibroso do estroma. HE. 200X; B) Gestação de 33 semanas com pré-eclâmpsia e exuberante necrose fibrinóide vilositária (setas). HE. 200X; C) Vilosidades de gestação de 36 semanas com pré-eclâmpsia com áreas focais de necrose fibrinóide vilosa (seta). HE. 200X; D) Vilosidades do 3º trimestre de gestação normal, com boa vascularização, nós sinciciais e discreto depósito de fibrina intervillosa (seta). Ausência de infiltrado inflamatório intra e intervilositário. HE. 200X.

## 5. Discussão

Após décadas de pesquisas, a patogênese da pré-eclâmpsia ainda não está totalmente esclarecida e, tentativas de identificar marcadores precoces da doença não conseguiram o sucesso esperado. Está bem definida a associação entre placentação anormal e pré-eclâmpsia, envolvendo invasão inadequada das arteríolas espiraladas maternas pelo trofoblasto, durante o início da gestação (Meekins et al., 1994; Polliotti et al., 2003). Vários marcadores bioquímicos foram identificados, tais como citocinas e fatores angiogênicos, que podem estar envolvidos na resposta imune presente na interface materno-fetal, favorecendo a aceitação do feto e da placenta.

No presente trabalho avaliamos a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias na placenta de gestantes normais e de portadoras de pré-eclâmpsia. As concentrações de TNF- $\alpha$  e de GM-CSF foram significativamente maiores nos homogenatos de placenta de gestantes com pré-eclâmpsia. Por outro lado, os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta_1$  foram significativamente menores nessas gestantes em relação às gestantes normais.

Esses resultados sugerem a exacerbação de um ambiente inflamatório na interface materno-fetal de gestantes com pré-eclâmpsia e, em concordância com a literatura, indicam que níveis elevados de citocinas inflamatórias na placenta podem exercer papel deletério no desenvolvimento da gestação. Diferentes linhas de evidência apontam que alterações nos níveis de citocinas podem estar envolvidas na patogênese da pré-eclâmpsia. Altos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  são detectados no soro e líquido amniótico de pacientes com pré-eclâmpsia (Darmochwal-Kolarz et al., 1999; Peraçoli et al., 2007). Hayashi et al. (2004) demonstraram aumento significativo nos níveis de GM-CSF em homogenatos placentários de gestantes com pré-eclâmpsia e sugeriram que a concentração elevada dessa citocina na placenta poderia estar relacionada às anormalidades imunológicas, que contribuem para a etiologia da doença.

O GM-CSF é uma citocina hematopoiética, potente mediadora da proliferação e diferenciação celulares em diferentes tecidos, com participação na formação e manutenção placentária (Hayashi et al., 2004). De acordo com Robertson (2007), os tecidos reprodutivos e o sistema imune sofrem mudanças para acomodar a gestação e essa citocina está envolvida no processo de implantação e subsequente desenvolvimento embrionário.

Altos níveis de TNF- $\alpha$  e GM-CSF são detectados no plasma (Darmochwal-Kolarz et al., 1999; Hayashi et al., 2004; Peraçoli et al., 2007; Cackovic et al., 2008) ou amostras placentárias de gestantes com pré-eclâmpsia (Hayashi et al., 2004; Kim et al., 2006), enquanto baixas concentrações das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta_1$  são observadas (Rein et al., 2003; Makris et al., 2006; Sharma et al., 2007; Lim et al., 2008). Desta forma, as citocinas podem facilitar ou prejudicar a implantação do ovo e o desenvolvimento gestacional, uma vez que estão envolvidas no controle da resposta imune materna, na modulação da tolerância imunológica e, conseqüentemente, nas condições oferecidas para o crescimento fetal. Na dependência do perfil, Th1 ou Th2, da concentração e do tempo de secreção em relação ao tecido alvo podem preceder as reações fisiopatológicas da pré-eclâmpsia (Kupferminc et al., 1994, 1994a; Vince et al., 1995; Hayashi et al., 2003; Rein et al., 2003; Orsi & Tribe, 2008).

A concentração elevada de TNF- $\alpha$  detectada na placenta de pacientes com pré-eclâmpsia está em acordo com Kim et al. (2006), que também encontraram níveis elevados de TNF- $\alpha$  em homogenatos placentários de gestantes com pré-eclâmpsia, quando comparadas com gestantes normais. Dong et al. (2005) pesquisaram citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras placentárias de gestantes com pré-eclâmpsia ou normais e verificaram maior liberação de TNF- $\alpha$  pelas células placentárias de gestantes com pré-eclâmpsia. Segundo os pesquisadores, esses resultados sugerem a ocorrência de alteração da imunidade, favorecendo o perfil Th1, do qual o TNF- $\alpha$  está associado e, sua produção elevada contribui para a patogênese da pré-eclâmpsia.

O TNF- $\alpha$  pode ser encontrado na placenta, líquido amniótico e decídua, modulando o crescimento trofoblástico e a invasão das arteríolas espiraladas em gestantes normais, quando produzido em níveis fisiológicos. Porém, em níveis excessivos pode restringir a invasão endovascular do citotrofoblasto às arteríolas espiraladas, contribuindo, dessa maneira, com a fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Peraçoli et al. 2007; Haider & Knöfler, 2008). Wang & Walsh (1996) detectaram maiores concentrações de TNF- $\alpha$  em homogenatos de tecido placentário e aumento de expressão dessa citocina, avaliada por RT-PCR, associadas à elevada peroxidação lipídica, concluindo que o tecido placentário de gestantes com pré-eclâmpsia possui maior potencial de produção de TNF- $\alpha$  do que o de gestantes normais. Essa citocina pode também contribuir para o desenvolvimento da doença, devido à sua capacidade de aumentar a geração de radicais livres de oxigênio, que causa estresse oxidativo e lesão endotelial (Kim et al., 2006). A hipoxia placentária,



presente em gestações complicadas por pré-eclâmpsia, também pode induzir uma superprodução de TNF- $\alpha$ . Confirmando esta hipótese, Hung et al. (2004) verificaram que em tecido placentário, obtido de gestação normal e submetido a processos de hipoxia e re-oxigenação, há aumento da produção de TNF- $\alpha$ . Segundo os autores, a elevação da expressão de TNF- $\alpha$  na placenta decorre do estresse oxidativo induzido pelo tratamento, resultando na formação de reativos intermediários do oxigênio. Assim, a perfusão deficiente da placenta, secundária à reduzida invasão trofoblástica, aumenta a secreção de TNF- $\alpha$ , contribuindo para ativação de células endoteliais, que caracteriza a fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

Na pré-eclâmpsia, níveis elevados de TNF- $\alpha$  podem inibir a proliferação celular, o crescimento e a função do trofoblasto, uma vez que esta citocina inibe a síntese de DNA pelo trofoblasto (Hunt, 1989). A função alterada da célula trofoblástica poderia limitar a invasão e conseqüentemente a alteração fisiológica das arteríolas espiraladas (Wang & Walsh, 1996).

O efeito do TNF- $\alpha$  sobre a proliferação de células trofoblásticas foi avaliado por Seki et al. (2007), em experimentos com soro e leucócitos isolados de sangue obtidos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e gestantes normais. A linhagem celular trofoblástica foi cultivada em presença do soro diluído dessas gestantes, os leucócitos foram fracionados em diferentes populações e a concentração dessa citocina foi determinada no sobrenadante das culturas e comparada entre as gestantes com pré-eclâmpsia e as normais. Observou-se que, as células em contato com soro de pacientes pré-eclâmpicas apresentaram apoptose e maior inibição na proliferação celular e, que os monócitos obtidos das gestantes com pré-eclâmpsia produziram concentrações maiores de TNF- $\alpha$ . Segundo os autores, em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, os monócitos estão ativados e produzem altas concentrações de TNF- $\alpha$ , que em contato com células trofoblásticas inibem a proliferação celular e induzem apoptose.

Portanto, embora não se saiba se o aumento de TNF- $\alpha$  é a causa ou conseqüência de pré-eclâmpsia, sua liberação pela placenta em estágios iniciais da gestação podem contribuir para as reações fisiopatológicas dessa síndrome (Peraçoli et al., 2007).

No presente trabalho, a análise da gravidade do quadro clínico da pré-eclâmpsia mostrou que as concentrações de TNF- $\alpha$  e de GM-CSF foram ainda maiores nas formas graves da doença. Esses resultados concordam com trabalho anterior, realizado em nosso laboratório, sugerindo que o TNF- $\alpha$  poderia ser considerado um marcador de gravidade da

pré-eclâmpsia, uma vez que observamos correlação dos níveis plasmáticos dessa citocina com diferentes estágios da doença (Peraçoli et al., 2007).

As concentrações significativamente menores de IL-10 e TGF- $\beta_1$ , detectadas na placenta de gestantes com pré-eclâmpsia do presente estudo, sugerem um defeito nos mecanismos imunológicos que desempenham papel importante na interação materno-fetal e na regulação da resposta inflamatória na placenta.

A IL-10 promove a placentação e, juntamente com TGF- $\beta_1$  está envolvida na regulação da invasão e proliferação do trofoblasto (Huber et al., 2002; Nagaeva et al., 2002). O crescimento e desenvolvimento da placenta são dependentes da produção adequada de IL-10 (Hennessy et al., 1999). Produção aumentada de IL-10 está associada com sucesso gestacional, enquanto baixos níveis dessa citocina são encontrados em casos de pré-eclâmpsia (Rein et al., 2003; Jonsson et al., 2005; Makris et al., 2006; Sharma et al., 2007). O principal papel da IL-10 é regular a produção de citocinas de perfil Th1 por linfócitos e macrófagos (de Waal et al., 1991; Fiorentino et al., 1991) que, no tecido trofoblástico, parece ser mediada pela progesterona (Choi et al., 2000). Na gestação normal, demonstrou-se que as células T $\gamma\delta$  da decídua expressam RNAm para IL-10 e TGF- $\beta$ , criando um ambiente de imunotolerância ao desenvolvimento do feto. Essas células, produzindo citocinas com atividade supressora, atuam como células T regulatórias ou induziriam a diferenciação de células T $\alpha\beta$  (Th0) em células regulatórias (Nagaeva et al., 2002). Portanto, a IL-10 teria um papel crítico em patologias da gestação associadas com defeito na regulação de resposta inflamatória na placenta (Rein et al., 2003).

Bowen et al. (2005) mostraram que células trofoblásticas placentárias de gestantes com pré-eclâmpsia e de gestantes normais, cultivadas sob condições de hipoxia durante 48 horas, produzem níveis menores de IL-10 em comparação com células cultivadas em condições normais de oxigenação. Os autores sugerem que a hipoxia placentária e a produção alterada de citocinas na placenta podem exercer importante papel na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Makris et al. (2006) verificaram menor expressão de mRNA para IL-10, bem como da proteína, em amostras placentárias de gestantes com pré-eclâmpsia em comparação com grávidas normais e concluíram que a pré-eclâmpsia está associada à deficiência de IL-10 na placenta, confirmando trabalhos de outros autores (Hennessy et al., 1999; Rein et al., 2003). Considerando a IL-10 uma citocina com potente

ação reguladora anti-inflamatória, a diminuição de sua produção pela placenta poderia estar associada com o desenvolvimento inadequado da mesma (Rein et al., 2003).

Nossa pesquisa demonstrou baixos níveis de IL-10 e altos níveis de TNF- $\alpha$ , principalmente em placentas de gestantes com pré-eclâmpsia grave, sugerindo importante alteração no mecanismo imune, que exerce papel importante na interface materno-fetal e na regulação da resposta inflamatória placentária. Esse desequilíbrio foi melhor observado quando comparou-se a razão TNF- $\alpha$ /IL-10 entre gestantes normais e com pré-eclâmpsia. Essa razão foi ainda maior na pré-eclâmpsia grave em relação à forma leve da doença, demonstrando prevalência de citocinas com padrão Th1 e concordando com os resultados obtidos por Dong et al. (2005), sugerindo que a predominância de um ambiente inflamatório na placenta, contribui para a fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

A citocina imunossupressora TGF- $\beta$  também contribui para o sucesso gestacional, uma vez que seu papel regulador é importante durante o processo de diferenciação do trofoblasto e transformação das arteríolas espiraladas, pois inibe a proliferação e diferenciação de linfócitos e a ativação de outros leucócitos, podendo ser considerada como um fator regulador envolvido na proteção e sobrevivência do feto (Ayatollahi et al. 2005).

No presente trabalho, os níveis dessa citocina regulatória nos homogenatos placentários foram significativamente menores em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia quando comparadas às gestantes normais. Na literatura, estudos sobre a presença de TGF- $\beta_1$  na placenta de gestantes com pré-eclâmpsia são escassos. Lyall et al. (2001) analisaram a expressão de TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  e TGF- $\beta_3$  na placenta e leito placentário de gestantes normais, com pré-eclâmpsia e com restrição de crescimento intra-uterino, verificando que não há diferença entre os grupos estudados, com relação à presença das três isoformas dessa citocina. Segundo os autores, a superfamília do TGF- $\beta$  não está relacionada com a fisiopatologia da pré-eclâmpsia e da restrição de crescimento intra-uterino. Por outro lado, Wang et al. (2006) detectaram maior expressão de TGF- $\beta_1$  no sinciciotrofoblasto viloso de gestantes com pré-eclâmpsia em comparação a gestantes normais, sugerindo que o TGF- $\beta_1$  pode participar do processo patogênico de lesão endotelial vascular, verificado na pré-eclâmpsia. Entretanto, não observaram diferença significativa quando compararam gestantes com pré-eclâmpsia leve ou grave.

No presente estudo, também não encontramos diferença significativa quanto à concentração de TGF- $\beta_1$  detectado na placenta, entre as formas leve ou grave de pré-

eclâmpsia. Resultados semelhantes foram anteriormente descritos por Hennessy et al. (2002), que analisaram a expressão de TGF- $\beta_1$  em placenta e soro de gestantes com essa patologia. A ausência de correlação entre os níveis de TGF- $\beta_1$  no soro e a pressão arterial permitiu aos autores concluir que o TGF- $\beta_1$  não tem papel no desenvolvimento de pré-eclâmpsia tardia e de hipertensão arterial.

Observamos forte associação de níveis elevados do fator anti-angiogênico Endostatina e diminuição na concentração de PIGF no tecido placentário, representada por valores elevados da razão Endostatina/PIGF em comparação com gestantes normais. Os valores observados, tanto na forma leve quanto na forma grave, foram significativamente maiores que os obtidos em gestantes normais e, ainda maiores na forma grave em relação à forma leve das gestantes com pré-eclâmpsia.

PIGF e VEGF são importantes mediadores locais de angiogênese na placenta humana (Shore et al., 1997) e detectados na circulação materna. Alterações na concentração desses fatores podem representar desenvolvimento anormal da placenta em gestações complicadas por pré-eclâmpsia (Polliotti et al., 2003). Vários estudos avaliaram níveis de PIGF no soro ou plasma de gestantes normais e de pacientes com pré-eclâmpsia, demonstrando valores de PIGF significativamente menores nas gestantes com pré-eclâmpsia (Livingston et al., 2000; Polliotti et al., 2003; Levine et al., 2004; Bersinger & Odegard, 2005; Kim et al., 2007). Mulheres com pré-eclâmpsia apresentam relação inversa entre níveis plasmáticos de PIGF e aumento da pressão diastólica (Madazli et al., 2003; Teixeira et al., 2008).

A demonstração de baixos níveis de PIGF na forma grave de pré-eclâmpsia quando comparada à forma leve, observada no presente trabalho, concorda com resultados de outros autores que detectaram maior anormalidade desse fator na pré-eclâmpsia grave (Robinson et al., 2006). Widmer et al. (2007), em revisão sistemática da literatura, que relaciona níveis elevados de sFlt-1 e baixos níveis de PIGF como fatores preditivos de pré-eclâmpsia, concluem que os resultados obtidos no terceiro trimestre da gestação estão associados com essa doença, especialmente com suas formas graves.

A maioria dos trabalhos da literatura, pertinente ao estudo de fatores pró e anti-angiogênicos, determina os níveis desses fatores na circulação materna com o objetivo de encontrar marcadores para predição do desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Os fatores angiogênicos mais estudados são PIGF, VEGF e TGF- $\beta_1$ , enquanto dentre os anti-angiogênicos estão o sFlt-1, receptor para VEGF e PIGF e a Endoglin, co-receptor para TGF- $\beta_1$ . Os resultados obtidos por Kim et al. (2007) mostram que concentrações

significativamente maiores de Flt-1 e Endoglinina solúveis estão associadas à baixa produção de PlGF e TGF- $\beta_1$  no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia, obtido no segundo trimestre de gestação. Os autores sugerem que as razões sFlt-1/PlGF e Endoglinina/TGF- $\beta_1$  podem ser empregadas como marcadores para diagnóstico precoce dessa patologia. Segundo Baumann et al. (2007), é crescente o número de agentes bioquímicos avaliados como marcadores para predição da pré-eclâmpsia, porém, nenhum deles ainda mostrou-se de valor clínico. Até o momento, os marcadores séricos mais promissores, como fator preditivo, são a proteína placentária PP-13, o sFlt-1, o PlGF e a Endoglinina, principalmente quando associados a dopplervelocimetria das artérias uterinas, realizada no primeiro trimestre da gestação. De Vivo et al. (2007) concluíram que Endoglinina, PlGF e sFlt-1, presentes no soro de gestantes normais obtido no período de 24 a 28 semanas e, posteriormente quando essas pacientes desenvolvem os sintomas clínicos de pré-eclâmpsia, podem ser utilizados para prever a doença, sendo a razão sFlt-1/PlGF um indicador mais preciso. A análise da alteração desses fatores em relação à idade gestacional mostra que os níveis séricos de PlGF, avaliados antes e após o aparecimento de pré-eclâmpsia, são significativamente mais baixos em gestantes que desenvolvem a doença precocemente em relação àquelas que a desenvolvem tardiamente (Ohkuchi et al., 2007; Wikstrom et al., 2007).

Nossos resultados mostram concentrações elevadas de Endostatina em homogenatos da placenta de gestantes com pré-eclâmpsia, sendo esses valores ainda maiores na forma grave da doença, quando comparados com a forma leve e com gestantes normais. A associação entre gravidade da pré-eclâmpsia e níveis elevados de Endostatina também foi verificada por Mahmoud & Abdel-Raouf (2006), que encontraram concentrações significativamente maiores desse fator anti-angiogênico no soro de gestantes com pré-eclâmpsia grave em comparação com a forma leve. Segundo os autores, os níveis elevados de Endostatina poderiam discriminar pré-eclâmpsia de gestação normal e a pré-eclâmpsia leve da grave. Por outro lado, Hirtenlehner et al. (2003) não observaram diferença significativa entre as concentrações de Endostatina de pacientes com pré-eclâmpsia leve ou grave, embora os valores encontrados fossem significativamente maiores do que nas gestantes normais.

Até o momento, não há relatos na literatura sobre a determinação desse fator anti-angiogênico em amostras placentárias de gestantes com pré-eclâmpsia. Os autores que encontraram concentração elevada de Endostatina no soro de gestantes com pré-eclâmpsia sugerem que esses níveis sistêmicos aumentados poderiam desempenhar papel importante

na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, por anular os efeitos do VEGF (Hirtenlehner et al., 2003; Mahmoud & Abdel-Raouf, 2006). Estudos empregando culturas de vilos placentários, tratadas com Endostatina recombinante, sugerem que esse fator inibidor pode modular a diferenciação do trofoblasto viloso (Pollheimer et al., 2004).

O exame histopatológico das placentas de gestantes com pré-eclâmpsia mostrou alterações representadas por aumento de nós sinciciais, aspecto fibroso do estroma vilositário, áreas de infarto, necrose fibrinóide vilosa e presença de fibrina perivilosa. Essas alterações foram observadas principalmente nas placentas de mulheres pré-eclâmplicas com idade gestacional inferior a 34 semanas, enquanto nas placentas com idade gestacional maior ou igual a 34 semanas e inferior a 37 semanas, as alterações foram discretas. As placentas com idade superior a 37 semanas de gestação apresentaram-se dentro do padrão histológico de normalidade, semelhante às de gestantes normais. Esses resultados são concordantes com a literatura. Segundo Roberts & Post (2008), a análise de placentas de gestantes com pré-eclâmpsia mostra alterações que podem ser consideradas grosseiramente normais e histologicamente apropriadas para a idade gestacional. A patologia placentária na pré-eclâmpsia reflete características indicativas de isquemia crônica, como menor peso, presença de infartos placentários, de vilos pequenos e hipermaduros, grande número de nós sinciciais e aumento do espaço intervilosos. Entretanto, essas alterações estão restritas a casos de pré-eclâmpsia grave pré-termo (Salafia et al., 1998) e geralmente estão ausentes em casos de termo ou pós-termo (Moldenhauer et al., 2003). Nossos resultados mostram que o maior número de alterações histopatológicas ocorreu nas placentas de gestantes com formas graves de pré-eclâmpsia, coincidentemente em sua maioria (84,6%) com diagnóstico de pré-eclâmpsia precoce.

No presente trabalho, pela primeira vez verificou-se que, quando as gestantes portadoras de pré-eclâmpsia foram estratificadas em pré-eclâmpsia precoce e pré-eclâmpsia tardia, as concentrações placentárias de TNF- $\alpha$  e de Endostatina foram significativamente maiores e, a concentração de IL-10 significativamente menor nas gestantes com pré-eclâmpsia precoce, corroborando o conceito que a manifestação precoce da doença está relacionada com comprometimento placentário. Além disso, as alterações histopatológicas da placenta foram mais evidentes nas gestantes com pré-eclâmpsia precoce.

Na pré-eclâmpsia parece haver um desequilíbrio patológico de fatores teciduais presentes no microambiente placentário responsáveis pela indução de fatores angiogênicos e mediadores vasoativos (Conrad & Benyo, 1997; Lam et al., 2005). Essas moléculas

atuam local e sistemicamente, promovendo adaptação fisiológica materna à demanda metabólica e expansão de volume sanguíneo (Teixeira et al., 2008). Alterações na produção de fatores de crescimento angiogênicos pela placenta apontam a pré-eclâmpsia como uma doença endotelial com conseqüências hipertensivas (Roberts & Lain, 2002).

## **6. Conclusões**

Os resultados do presente estudo permitiram concluir:

6.1. Placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia precoce apresentam aceleração do seu amadurecimento e lesões histopatológicas de maior gravidade, quando comparadas com placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia tardia e gestantes normais.

6.2. O desequilíbrio entre fatores angiogênicos (PIGF) e anti-angiogênicos (Endostatina), bem como níveis elevados de TNF- $\alpha$  e baixa produção de IL-10, detectados em tecido placentário, podem estar associados com comprometimento da placenta na pré-eclâmpsia e com a gravidade da doença.

6.3. Níveis elevados de TNF- $\alpha$  e Endostatina e valores diminuídos de IL-10 na placenta caracterizam a pré-eclâmpsia precoce.

Considerando que a placenta mantém íntimo contato com grande quantidade de sangue periférico materno, é possível que as concentrações das citocinas e fatores, detectadas na placenta, possam representar níveis produzidos tanto por tecidos placentários como por células do sangue periférico. A detecção de citocinas e fatores pró e anti-angiogênicos nos tecidos placentários, por imunohistoquímica, poderá confirmar sua produção pela placenta e, portanto seu papel na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

## 7. Referências Bibliográficas \*

Abbas AK, Lichtman AH, Pilai S. *Imunologia celular e molecular*, 6<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro – RJ: Elsevier Editora Ltda, 2008. p. 267-301.

Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2004; 51(4):275–82.

Ahmad S, Ahmed A. Regulation of soluble VEGFR-1 by VEGF and oxygen and its elevation in pre-eclampsia and fetal growth restriction. *Placenta*. 2001; 22:A7.

Ahmad S, Ahmed A. [Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia](#). *Circ Res*. 2004; 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.

Aref S, El-Sherbiny M, Azmy E, Goda T, Selim T, El-Refaie M et al. Elevated serum endostatin levels are associated with favorable outcome in acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2008; 13(2):95-100.

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

Baumann MU, Bersinger NA, Surbek DV. [Serum markers for predicting pre-eclampsia](#). *Mol Aspects Med*. 2007; 28(2):227-44.

Bersinger NA, Ødegård RA. [Serum levels of macrophage colony stimulating, vascular endothelial, and placenta growth factor in relation to later clinical onset of pre-eclampsia and a small-for-gestational age birth](#). *Am J Reprod Immunol*. 2005; 54(2):77-83.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *JAMA*. 1997; 277:927-34.



Boulanger H, Flamant M. [New insights in the pathophysiology of preeclampsia and potential therapeutic implications.](#) Nephrol Ther. 2007; 3(7):437-48.

[Bowen RS, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF, Wang Y.](#) Hypoxia promotes interleukin-6 and -8 but reduces interleukin-10 production by placental trophoblast cells from preeclamptic pregnancies. J Soc Gynecol Investig. 2005; 12(6):428-32.

Buhimschi CS, Norwitz ER, Funai E, Richman S, Guller S, Lockwood CJ et al. [Urinary angiogenic factors cluster hypertensive disorders and identify women with severe preeclampsia.](#) Am J Obstet Gynecol. 2005; 192(3):734-41.

Burton GJ, Jauniaux E. [Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia.](#) J Soc Gynecol Investig. 2004; 11(6):342-52.

Cackovic M, Buhimschi CS, Zhao G, Funai EF, Norwitz ER, Kuczynski E et al. Fractional excretion of tumor necrosis factor-alpha in women with severe preeclampsia. Obstet Gynecol. 2008; 112(1):93-100.

Calderon IM, Damasceno DC, Amorin RL, Costa RA, Brasil MA, Rudge MV. [Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes.](#) Diabetes Res Clin Pract. 2007; 78(1):65-71.

Choi BC, Polgar K, Xiao L, Hill JA. [Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss.](#) Hum Reprod. 2000; 15(Suppl 1):46-59.

Conrad KP, Benyo DF. [Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia.](#) Am J Reprod Immunol. 1997; 37(3):240-9.

Curry AE, Vogel I, Skogstrand K, Drews C, Schendel DE, Flanders WD et al. Maternal plasma cytokines in early- and mid-gestation of normal human pregnancy and their association with maternal factors. J Reprod Immunol. 2008; 77(2):152-60.

Daher S, Sass N, Oliveira LG, Mattar R. Cytokine genotyping in preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 2006; 55(2):130-5.

Damsky CH, Fisher SJ. [Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors.](#) Curr Opin Cell Biol. 1998; 10(5):660-6.

Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzela B, Rolinski J, Oleszczuk J. T helper 1- and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1999; 86(2):165-70.

De Vivo A, Baviera G, Giordano D, Todarello G, Corrado F, D'anna R. [Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia](#). Acta Obstet Gynecol Scand. 2008; 87(8):837-42.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. [Interleukin 10 \(IL-10\) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes](#). J Exp Med. 1991; 174(5):1209-20.

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

Dekker GA. The partner's role in the etiology of preeclampsia. J Reprod Immunol. 2002; 57(1-2):203-15.

Dekker GA. [Prothrombotic mechanisms in preeclampsia](#). Thromb Res. 2005; 115(Suppl 1):17-21.

Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB, [Lutsenko SV](#), [Severin SE](#). Endostatin: current concepts about its biological role and mechanisms of action. Biochemistry. 2007; 72(3):235-46.

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.

Djurovic S, Schjetlein R, Wisløff F, Haugen G, Husby H, Berg K. [Plasma concentrations of Lp\(a\) lipoprotein and TGF-beta1 are altered in preeclampsia](#). Clin Genet. 1997; 52(5):371-6.

Dong M, He J, Wang Z, Xie X, Wang H. Placental imbalance of Th1- and Th2- type cytokines in preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2005; 84(8):788-93.

Elsheikh A, Creatas G, Mastorakos G, Milingos S, Loutradis D, Michalas S. [The renin-aldosterone system during normal and hypertensive pregnancy.](#) Arch Gynecol Obstet. 2001; 264(4):182-5.

Erskine KJ, Iversen SA, Davies R. An altered ratio of 18:2 (9,11) to 18:2 (9,12) linoleic acid in plasma phospholipids as a possible predictor of pre-eclampsia. Lancet. 1985; 1(8428):554-5.

Feinberg BB. [Preeclampsia: the death of Goliath.](#) Am J Reprod Immunol. 2006; 55(2):84-98.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. [IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.](#) J Immunol. 1991; 147(11):3815-22.

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.

Ghosh D, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Dhawan L, Dhara S, Smith SK et al. [Expression of vascular endothelial growth factor \(VEGF\) and placental growth factor \(PlGF\) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey.](#) Mol Hum Reprod. 2000; 6(10):935-41.

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.

Haider S, Knöfler M. [Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium.](#) Placenta. 2008; doi:10.1016/j.placenta.2008.10.012.

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.

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

Hennessy A, Graham G, Hastings J, Siddons DP, Zhong Z. [New pressure flow cell to monitor BaSO<sub>4</sub> precipitation using synchrotron in situ angle-dispersive X-ray diffraction.](#) J Synchrotron Radiat. 2002; 9(Pt 5):323-4.

Hirtenlehner K, Pollheimer J, Lichtenberger C, Wolschek MF, Zeisler H, Husslein P et al. [Elevated serum concentrations of the angiogenesis inhibitor endostatin in preeclamptic women.](#) J Soc Gynecol Investig. 2003; 10(7):412-7.

Huber A, Hefler L, Tempfer C, Zeisler H, Lebrecht A, Husslein P. [Transforming growth factor-beta 1 serum levels in pregnancy and pre-eclampsia.](#) Acta Obstet Gynecol Scand. 2002; 81(2):168-71.

[Huddleston H, Schust DJ.](#) Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation. [Am J Reprod Immunol.](#) 2004; 51(4):283-9.

Hung TH, Burton GJ. [Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia.](#) Taiwan J Obstet Gynecol. 2006; 45(3):189-200.

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.

Hunt JS. [Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells.](#) J Reprod Immunol. 1989; 16(1):1-17.

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

Ito M, Itakura A, Ohno Y, Nomura M, Senga T, Nagasaka T et al. [Possible activation of the renin-angiotensin system in the feto-placental unit in preeclampsia.](#) J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87(4):1871-8.

Jokhi PP, King A, Loke YW. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. Hum Reprod. 1994; 9(9):1660-9.

Jonsson Y, Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Nieminen K, Ekerfelt C. [Indications of an altered immune balance in preeclampsia: a decrease in in vitro secretion of IL-5 and IL-10 from blood mononuclear cells and in blood basophil counts compared with normal pregnancy.](#) J Reprod Immunol. 2005; 66(1):69-84.

Jonsson Y, Rubèr M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. [Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies.](#) J Reprod Immunol. 2006; 70(1-2):83-91.

Kelemen K, Paldi A, Tinneberg H, Torok A, Szekeres-Bartho J. [Early recognition of pregnancy by the maternal immune system.](#) Am J Reprod Immunol. 1998; 39(6):351-5.

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.

Kharb S, Gulati N, Singh V, Singh GP. Superoxide anion formation and glutathione levels in patients with preeclampsia. Gynecol Obstet Invest. 2000; 49(1):28-30.

Kharfi A, Giguère Y, Sapin V, Massé J, Dastugue B, Forest JC. [Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines.](#) Clin Biochem. 2003; 36(5):323-31.

Kim YH, Kim CH, Cho MK, Kim KM, Lee SY, Ahn BW et al. [Total peroxyl radical-trapping ability and anti-oxidant vitamins of the umbilical venous plasma and the placenta in pre-eclampsia.](#) J Obstet Gynaecol Res. 2006; 32(1):32-41.

Kim SY, Ryu HM, Yang JH, Kim MY, Han JY, Kim JO. Increased sFlt-1 to PlGF ratio in women who subsequently develop preeclampsia. J Korean Med Sci. 2007; 22(5):873-7.

Kingdom JCP, Kaufmann P. [Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia.](#) Placenta. 1997; 18(8):613-21.

Kita N, Mitsushita J. [A possible placental factor for preeclampsia: sFlt-1.](#) Curr Med Chem. 2008; 15(7):711-5.

[Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T](#) et al. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. [J Clin Endocrinol Metab.](#) 2003; 88(5):2348-51.

Kupfermanc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 170(6):1752-7.

Kupfermanc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Tamura RK, Rehnberg KA, Socol ML. Immunoreactive tumor necrosis factor- $\alpha$  is elevated in maternal plasma but undetected in amniotic fluid in the second trimester. *Am J Obstet Gynecol.* 1994a; 171(4):976-9.

Lam C, Lim KH, Karumanchi AS. [Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia.](#) *Hypertension.* 2005; 46(5):1077-85.

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004; 350(7):672-83.

[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.](#)

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.

Livingston JC, Chin R, Haddad B, McKinney ET, Ahokas R, Sibai BM. [Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia.](#) *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(6):1554-7.

Lyall 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.

Madazli R, Aydin S, Uludag S, Vildan O, Tolun N. [Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels.](#) *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003; 82(9):797-802.

Mahmound RA, Abdel-Raouf M. Serum endostatin and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia. *East Mediterr Health J.* 2006; 12(1-2):178-87.

Makris A, Xu B, Yu B, Thornton C, Hennessy A. Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to an IL-10 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.

Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y, Sharma S. [Immunology of preeclampsia](#). *Chem Immunol Allergy*. 2005; 89:49-61.

Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. [Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies](#). *Placenta*. 2004; 25(2-3):127-39.

Mayhew TM, Wijesekara J, Baker PN, Ong SS. [Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by pre-eclampsia](#). *Placenta*. 2004a; 25(10):829-33.

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S et al. [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.

Maynard SE, Moore Simas TA, Solitro MJ, Rajan A, Crawford S, Soderland P et al. [Circulating angiogenic factors in singleton vs multiple-gestation pregnancies](#). *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198(2):200.e1-7.

Meekins JW, McLaughlin PJ, West DC, McFadyen IR, Johnson PM. [Endothelial cell activation by tumour necrosis factor-alpha \(TNF-alpha\) and the development of pre-eclampsia](#). *Clin Exp Immunol*. 1994; 98(1):110-4.

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.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:683-765.

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

Muy-Rivera M, Sanchez SE, Vadachkoria S, Qiu C, Bazul V, Williams MA. [Transforming growth factor-beta1 \(TGF-beta1\) in plasma is associated with preeclampsia risk in Peruvian women with systemic inflammation.](#) Am J Hypertens. 2004; 17(4):334-8.

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

[Nagaeva O, Jonsson L, Mincheva-Nilsson L.](#) Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gamma delta T cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. [Am J Reprod Immunol.](#) 2002; 48(1):9-17

Nakatsukasa H, Masuyama H, Takamoto N, Hiramatsu Y. [Circulating leptin and angiogenic factors in preeclampsia patients.](#) Endocr J. 2008; 55(3):565-73.

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.

Ohkuchi A, Hirashima C, Matsubara S, Suzuki H, Takahashi K, Arai F et al. [Alterations in placental growth factor levels before and after the onset of preeclampsia are more pronounced in women with early onset severe preeclampsia.](#) Hypertens Res. 2007; 30(2):151-9.

Okamoto T, Niu R, Mizutani S, Yamada S. Levels of placenta growth factor in gestational trophoblastic diseases. Am J Obstet Gynecol. 2003; 188(1):135-40.

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.



Peraçoli JC, Martins RAR, Cruz MSP, Peraçoli MTS. Aspectos imunológicos da interface materno-fetal. *Femina* 2003; 31:247-51.

Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. 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.

Perkins AV. [Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia.](#) *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006; 46(2):77-83.

Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. [Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor \(PlGF\).](#) *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999; 237:31-40.

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.

Pollheimer J, Bauer S, Huber A, Husslein P, Aplin JD, Knöfler M. Expression pattern of collagen XVIII and its cleavage product, the angiogenesis inhibitor endostatin, at the fetal-maternal interface. *Placenta.* 2004; 25(10):770-9.

Polliotti BM, Fry AG, Saller DN, [Mooney RA](#), [Cox C](#), [Miller RK](#). Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003; 101(6):1266-74.

Raghupathy R. [Manipulation of cytokine production profiles as a therapeutic approach for immunologic pregnancy loss.](#) *Indian J Biochem Biophys.* 2008; 45(4):229-36.

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

Rajakumar A, Powers RW, Hubel CA, Shibata E, von Versen-Höyneck F, Plymire D et al. [Novel soluble flt-1 isoforms in plasma and cultured placental explants from normotensive pregnant and preeclamptic women.](#) *Placenta.* 2009; 30(1):25-34.

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. 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.

Roberts JM, Lain KY. [Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia](#). Placenta. 2002; 23(5):359-72.

Roberts DJ, Post MD. [The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction](#). J Clin Pathol. 2008; 61(12):1254-60.

Robertson SA. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18(3-4):287-98.

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

Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY, Armstrong DM, Wang W. [Evaluation of placenta growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 receptor levels in mild and severe preeclampsia](#). Am J Obstet Gynecol. 2006; 195(1):255-9.

Rossant J, Cross JC. [Placental development: lessons from mouse mutants](#). Nat Rev Genet. 2001; 2(7):538-48.

Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. J Reprod Immunol. 2003; 59(2):161-73.

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.

Salafia CM, Pezzullo JC, Ghidini A, Lopèz-Zeno JA, Whittington SS. [Clinical correlations of patterns of placental pathology in preterm pre-eclampsia.](#) Placenta. 1998; 19(1):67-72.

Schmidt M, Hoffmann B, Beelen D, Gellhaus A, Winterhager E, Kimmig R et al. [Detection of circulating trophoblast particles in peripheral maternal blood in preeclampsia complicated pregnancies.](#) Hypertens Pregnancy. 2008; 27(2):131-42.

Seki H, Matuoka K, Inooku H, Takeda S. TNF-alpha from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line. J Obstet Gynaecol Res. 2007; 33(4):408-16.

Sharma A, Satyam A, Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. Am J Reprod Immunol. 2007; 58(1):21-30.

Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. [Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast.](#) Placenta. 1997; 18(8):657-65.

Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. [Pre-eclampsia.](#) Lancet. 2005; 365(9461):785-99.

Stanczuk GA, McCoy MJ, Hutchinson IV, Sibanda EN. The genetic predisposition to produce high levels of TGF-beta1 impacts on the severity of eclampsia/pre-eclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2007; 86(8):903-8.

Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T et al. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. Virchows Arch. 2004; 444(1):49-55.

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.

Teixeira PG, Cabral AC, Andrade SP, Reis ZS, da Cruz LP, Pereira JB et al. Placental growth factor (PIGF) is a surrogate marker in preeclamptic hypertension. *Hypertens Pregnancy*. 2008; 27(1):65-73.

Theillin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12(6):731-7.

Tjoa ML, Oudejans CB, van Vugt JM, Blankenstein MA, van Wijk IJ. [Markers for presymptomatic prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction](#). *Hypertens Pregnancy*. 2004; 23(2):171-89.

Torry DS, Wang HS, Wang TH, Caudle MR, Torry RJ. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placental growth factor. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 179(6pt1): 1539-44.

Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C. 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 et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006; 12(6):642-9.

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

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

Walker JJ. [Pre-eclampsia](#). *Lancet*. 2000; 356(9237):1260-5.

Walsh SW. [Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia.](#) Semin Reprod Endocrinol. 1998; 16(1):93-104.

Wang Y, Walsh SW. [TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas.](#) J Reprod Immunol. 1996; 32(2):157-69.

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.

[Wickens D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL.](#) Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. [Ann Clin Biochem.](#) 1981; 18(Pt 3):158-62.

Widmer M, Villar J, Benigni A, Conde-Agudelo A, Karumanchi SA, Lindheimer M. [Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: a systematic review.](#) Obstet Gynecol. 2007; 109(1):168-80.

Wikström AK, Larsson A, Eriksson UJ, Nash P, Nordén-Lindeberg S, Olovsson M. [Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia.](#) Obstet Gynecol. 2007; 109(6):1368-74.

Williams MA, Zingheim RW, King IB, Zebelman AM. Omega-3 fatty acids in maternal erythrocytes and risk of preeclampsia. Epidemiology. 1995; 6(3):232-7.