



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CAROLINE CRISTINA PINTO SOUZA

**CORRELAÇÕES ENTRE H₂S, NO E OS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS NA
PRÉ-ECLÂMPSIA**

BOTUCATU

2019

CAROLINE CRISTINA PINTO-SOUZA

**CORRELAÇÕES ENTRE H₂S, NO E OS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS NA
PRÉ-ECLÂMPSIA**

Monografia apresentada como requisito à obtenção de conclusão do Ensino Superior em Ciências Biomédicas (Bacharelado) no Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP)

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim
Co-Orientador: Dr. José Sérgio Possomato Vieira

BOTUCATU

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pinto-Souza, Caroline Cristina.

Correlações entre H₂S, NO e os biomarcadores plasmáticos na pré-eclâmpsia / Caroline Cristina Pinto-Souza. - Botucatu, 2019

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Valéria Cristina Sandrim

Coorientador: José Sérgio Possomato Vieira

Capes: 21008000

1. Pré-eclâmpsia. 2. Estresse oxidativo. 3. Óxido nítrico.
4. Sulfeto de hidrogênio.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Óxido nítrico;
Pré-eclâmpsia; Sulfeto de hidrogênio.

TERMO DE APROVAÇÃO

CAROLINE CRISTINA PINTO SOUZA

CORRELAÇÕES ENTRE H₂S, NO E OS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS NA PRÉ-ECLÂMPSIA

Monografia aprovada como requisito à obtenção do certificado de conclusão do Ensino Superior em Ciências Biomédicas (Bacharelado), no Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim
Orientadora – Departamento de Farmacologia

Prof. Dr. Carlos Alan Cândido Dias Júnior
Parecerista - Departamento de Farmacologia

Prof. Associado Ary Fernandes Júnior
Avaliador da Apresentação Oral - Departamento de Microbiologia e Imunologia

Botucatu, ____ de dezembro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais, os quais,
constantemente me incentivam nos estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas imensas bênçãos que concede em minha vida.

Aos meus pais por investirem sobremaneira na minha carreira acadêmica.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

À Prof. Dra. Valéria Cristina Sandrim, minha Orientadora, pelo perfil empático, palavras de conforto e sábios estímulos.

Ao Dr. José Sérgio Possomato Vieira, meu Co-Orientador, pelos diálogos cordiais, agregativos e intensa pró-atividade.

Ao Hélio Kushima, Assistente Superior Acadêmico, pelo auxílio nas técnicas de bancada e nos experimentos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram neste trabalho.

“A perseverança produz um caráter aprovado;
e o caráter aprovado produz confiança.”

Romanos 5:4

RESUMO

PINTO-SOUZA, C. C. Correlações entre H₂S, NO e os biomarcadores plasmáticos na pré-eclâmpsia. 2019. **Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.**

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome hipertensiva (pressão arterial acima de 140/90 mmHg após 20 semanas de gravidez) que afeta de 4 a 7% de todas as gestações. As genitoras e fetos que apresentam essa anormalidade têm maior propensão a desenvolver doenças crônicas futuramente. Durante a PE ocorre uma redução nos níveis de óxido nítrico (NO), uma substância vasodilatadora derivada do endotélio, e essa queda é sinalizada na disfunção endotelial. Recentes pesquisas demonstraram a participação do sulfeto de hidrogênio (H₂S), uma molécula gasosa, nas funções cardiovasculares. Este gás compartilha diversas estruturas e funções com o NO, respondendo a vários estímulos, a citar, a regulação da contratilidade vascular e de sua integridade estrutural, além de ser pró-angiogênico. De modo significativo, estudos exprimiram que o decréscimo dos níveis plasmáticos do H₂S ou de suas enzimas produtoras ocorre na PE, ao mesmo tempo em que manifestaram como esse gás promoveu a fosforilação da eNOS em células endoteliais com consequente aumento da síntese de NO. Evidenciando, desse modo, o *crosstalk* entre esses dois gasotransmissores. Assim, a temática e o objetivo deste trabalho são a investigação dos níveis plasmáticos do H₂S e do NO, além de analisar possíveis correlações entre eles e os marcadores de estresse oxidativo: carbonil e malonaldeído (MDA); o nitrito plasmático, um metabólito estável do NO e o sFlt-1, um fator antiangiogênico. À vista disso, exploramos parâmetros clínicos e os marcadores em 120 mulheres com gestação saudável (GS), 88 com hipertensão gestacional (HAG) – síndrome hipertensiva com ausência da proteinúria e da lesão renal, e 62 com PE. A dosagem do H₂S plasmático e dos marcadores carbonil e MDA foi feita por métodos colorimétricos, a do nitrito plasmático, pela análise de quimioluminescência e a concentração do sFlt-1 no plasma foi determinada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Constatamos diferenças significativas nas comparações entre a GS e a HAG e entre a GS e a PE nas variáveis clínicas IMC, pressão diastólica e sistólica (já esperadas nestas duas últimas), demonstrando como essas desordens hipertensivas na gestação possuem tais parâmetros alterados. No peso do recém-nascido; nas semanas gestacionais na coleta e no parto, houve contrastes relevantes entre a GS e a PE e entre a HAG e a PE. Com exceção do MDA, todos os marcadores apresentaram algum tipo de discrepância sugestiva entre os grupos. Quanto aos níveis de H₂S no plasma, observamos uma diferença significativa somente entre a GS e HAG ($p < 0,01$). Isto, mesmo que as médias se assemelham entre os grupos: GS (18,48); HAG (23,44) e PE (20,00). Considerando todas as categorias de medicamentos anti-hipertensivos, a média das concentrações plasmáticas de H₂S na HAG variaram entre 2,98 μ M e 67,17 μ M e na PE, entre 1,03 μ M e 51,36 μ M. Apresentaram correlações significativas com o nitrito plasmático, a HAG ($p = 0,01$) e a PE ($p = 0,02$) e esta última também exibiu um p significativo ($< 0,01$) com a carbonil. Logo, pelo o que foi supraposto, indicamos que existem correlações entre o H₂S, NO e os biomarcadores plasmáticos nos diferentes grupos experimentais apresentados.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia; Sulfeto de hidrogênio; Óxido nítrico; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

PINTO-SOUZA, C. C. Correlations between H₂S, NO and preeclampsia plasma biomarkers. 2019. **Dissertation. Institute of Biosciences, Paulista State University, Botucatu, 2019.**

Preeclampsia (PE) is a hypertensive syndrome (blood pressure above 140/90 mmHg after 20 weeks of pregnancy) that affects 4 to 7% of all pregnancies. Mothers and fetuses with this abnormality are more likely to develop chronic diseases in the future. During PE there is a reduction in the levels of nitric oxide (NO), an endothelium-derived vasodilator, and this drop is signaled in endothelial dysfunction. Recent researches have shown the role of hydrogen sulfide (H₂S), a gaseous molecule, in cardiovascular functions. This gas shares various structures and functions with NO, responding to various stimuli, to cite, the regulation of vascular contractility and its structural integrity, in addition to being pro-angiogenic. Significantly, studies have shown that the decrease in plasma levels of H₂S or its producing enzymes occurs in PE, while showing how this gas promoted eNOS phosphorylation in endothelial cells with consequent increase in NO synthesis. Thus evidencing the crosstalk between these two gas-transmitters. Thereby, the theme and objective of this work are the investigation of plasma levels of H₂S and NO, besides analyzing possible correlations between them and the markers of oxidative stress: carbonyl and malonaldehyde (MDA); plasma nitrite, a stable NO metabolite, and sFlt-1, an antiangiogenic factor. In view of this, we explored clinical parameters and markers in 120 women with healthy pregnancy (GS), 88 with gestational hypertension (HAG) - hypertensive syndrome without proteinuria and renal injury, and 62 with PE. Plasma H₂S, carbonyl and MDA markers were measured by colorimetric methods; the plasma nitrite by chemiluminescence analysis and plasma sFlt-1 concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We found significant differences in comparisons between GS and HAG and between GS and PE in the clinical variables BMI, diastolic and systolic pressure (already expected in the latter two), demonstrating how these hypertensive disorders in pregnancy have such altered parameters. In the weight of the newborn; in the gestational weeks at collection and delivery, there were relevant contrasts between GS and PE and between HAG and PE. With the exception of MDA, all markers showed some suggestive discrepancy between the groups. Regarding plasma H₂S levels, we observed a significant difference only between GS and HAG ($p < 0.01$). This, even though the averages are similar between the groups: GS (18.48); HAG (23.44) and PE (20.00). Considering all categories of antihypertensive drugs, the mean plasma concentrations of H₂S in HAG varied between 2.98 μ M and 67.17 μ M and in PE, between 1.03 μ M and 51.36 μ M. They showed significant correlations with plasma nitrite to HAG ($p = 0.01$) and PE ($p = 0.02$) and the latter also exhibited a significant $p (< 0.01)$ with carbonyl. Therefore, from the above, we indicate that there are correlations between H₂S, NO and plasma biomarkers in the different experimental groups presented.

Keywords: Preeclampsia; Hydrogen sulphide; Nitric oxide; Oxidative stress.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 CONTEXTO E PROBLEMA	10
1.2 OBJETIVOS	13
2 METODOLOGIA	13
2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSSÃO	22
CONCLUSÃO	25
5 REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

A pré-eclâmpsia (PE) se trata de uma síndrome hipertensiva (pressão arterial acima de 140/90 mmHg após 20 semanas de gravidez) que afeta de 4 a 7% de todas as gestações, atuando como um dos principais contribuintes à morbidade e mortalidade materna (cerca de 70.000 óbitos durante a gravidez) e fetal (4 milhões de recém-nascidos nascem com restrição de crescimento) em todo o mundo, como consta na perspectiva clínica de Högberg (2005).

As genitoras e fetos que apresentam essa anormalidade possuem propensão a desenvolver futuramente doenças crônicas, a citar, riscos cardiovasculares (PAAUW; LELY, 2018; TANZ et al., 2018). Os sintomas mais recorrentes incluem a lesão renal e a proteinúria – sinalizadoras de menores taxas de filtração glomerular e do fluxo plasmático, além da endoteliose cerebral que pode culminar em convulsões (THE AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2014).

Denota-se ainda que a falta de remodelamento das artérias espiraladas na PE leva à constrição de vasos e decresce o fluxo sanguíneo uteroplacentário (DE GROOT; TAYLOR, 1993; DEKKER; SIBAI, 1998). Essa diminuição no fluxo, por conseguinte, acarretará na placenta com isquemia/hipóxia. Em tal circunstância, ela liberará fatores bioativos na corrente sanguínea, os quais promovem uma disfunção endotelial generalizada (ROBERTS, 1998), caracterizada pelo aumento na produção de substâncias vasoconstritoras derivadas do endotélio, como a endotelina e pela diminuição de substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio, como o óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), conforme revisado (POSSOMATO-VIEIRA; KHALIL, 2016).

Nesse contexto, o *fms-like* tirosina quinase solúvel (sFlt-1), um importante fator antiangiogênico que antagoniza a circulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator de crescimento placentário (PlGF) (KENDALL; WANG; THOMAS, 1996; SHIBUYA, 2001), é liberado pela placenta dessas mulheres (MAYNARD et al., 2003). Um aumento nos níveis do sFlt-1 é consistentemente observado na PE, mesmo em fases da gravidez onde a síndrome clínica completa ainda não se desenvolveu (NOORI et al., 2010). Também, a sua administração a ratas prenhes provoca hipertensão, proteinúria e endoteliose glomerular (MAYNARD et al., 2003).

Relaxante do músculo liso vascular, o NO se trata de uma molécula gasosa gerada a partir da L-arginina, a qual é convertida em L-citrulina pela eNOS, a isoforma endotelial da

NO sintase (NOS) (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988). A L-arginina é inibida pelo N-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), o qual impede a síntese do NO (PALMER; MONCADA, 1989), que é produzido pela isoforma induzível (iNOS), neuronal (nNOS) e predominantemente no endotélio pela eNOS.

Já foi relatado a existência de uma relação inversamente proporcional entre os níveis plasmáticos de sFlt-1 e do NO (SANDRIM et al., 2008), neste estudo, se denota que em mulheres com PE, os níveis do primeiro se apresentam elevados e os do segundo diminuídos. Ademais, a concentração de nitrito, um metabólito estável do NO, se encontra reduzida no plasma e na placenta de mulheres com PE e também, a expressão da eNOS está diminuída nesta condição (SANDRIM et al., 2008; ELEUTERIO et al., 2013; WANG et al., 2015).

Juntamente com o NO, o sulfeto de hidrogênio (H₂S), uma molécula de sinalização de gás ubíqua (adaptável em outros meios e temperaturas), desempenha funções cardiovasculares (HOLWERDA; KARUMANCHI; LELY, 2015). Eles compartilham papéis relevantes, respondendo a vários estímulos tanto os fisiológicos quanto os patológicos, a citar, a regulação da contratilidade vascular e de sua integridade estrutural. Promovendo, à vista disso, um impacto profundo na angiogênese e, por conseguinte, levando benefícios ao organismo (ALTAANY; YANG; WANG, 2013).

O impacto pró-angiogênico trazido pelo H₂S como a revascularização após isquemia, e a participação na sinalização do VEGF (KANAGY; SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017), é influenciado por qualquer umas das suas três enzimas geradoras (LI; ROSE; MOORE, 2011; MUSTAFA et al., 2011). São elas: a Cistationina- γ -liase (CTH/CSE) encontrada no citosol (WU et al., 2012); a Cistationina- β -sintase (CBS) e a 3-Mercaptopiruvato sulfurtransferase (3MST) - estas duas manifestas no citosol e nas mitocôndrias (KIMURA et al., 2017). E todas são expressas nas paredes vasculares (PAPAPETROPOULOS et al., 2009; SAHA et al., 2016).

O H₂S detém propriedades vasodilatadoras na permeabilidade vascular, desempenhando papel essencial, como na anti apoptose e na vasoatividade; na proteção contra a oxidação e inflamação, bem como evita a progressão e limita a gravidade da aterosclerose, dentre outros aspectos que contribuam para a homeostase tecidual/biológica do organismo e à redução da pressão arterial, conforme revisado (KANAGY; SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017). E de modo significativo, foi demonstrado o decréscimo dos níveis plasmáticos do H₂S ou de suas enzimas produtoras em mulheres pré-eclâmpicas (CINDROVA-DAVIES et al., 2013; WANG et al., 2013).

Consideravelmente, achados demonstram o *crosstalk* entre o H₂S e o NO. Já foi exprimido que o H₂S promoveu a fosforilação da eNOS em células endoteliais e portanto,

aumentou a síntese de NO (ALTAANY; YANG; WANG, 2013). Sob outra perspectiva, a inibição de CSE diminui a biodisponibilidade de NO (ALTAANY; YANG; WANG, 2013). Além disso, o H₂S induziu a formação do tubo endotelial, contudo, esse processo foi revertido após o uso do L-NAME, inibidor da NOS (ALTAANY; YANG; WANG, 2013).

Como na PE ocorre uma invasão defeituosa do trofoblasto e o fluxo sanguíneo arterial se torna intermitente, surge, dessa maneira, um ambiente hipóxico que propicia a inflamação, o dano e o estresse oxidativo (SÁNCHEZ-ARANGUREN et al., 2014). Este último, conforme revisado, é definido como um desbalanço “entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses” (BARBOSA et al., 2010).

Num recente estudo (TARAVATI; TOHIDI, 2018), os pesquisadores descobriram que a carbonil, uma proteína que pode ser gerada pela oxidação direta de resíduos de aminoácidos; pela clivagem oxidativa de proteínas ou por meio da reação com o malonaldeído (MDA) (BERLETT; STADTMAN, 1997), se encontra significativamente aumentada no plasma de mulheres pré-eclâmpicas. Diante disso, certamente os níveis da carbonil podem servir como biomarcadores úteis e sensíveis aos danos proteicos induzidos por estresse oxidativo, resultando em maiores concentrações plasmáticas da proteína carbonilada devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (TARAVATI; TOHIDI, 2018).

Em gestações normais, todavia, a produção placentária de EROs é contrabalançada pela presença de antioxidantes abundantes (ALI; KHALIL, 2015). Nesta circunstância, níveis elevados de estrogênio ativam no endotélio vascular, a produção de NO, que é responsável por efeitos vasorelaxantes e anticoagulantes através da regulação positiva do monofosfato cíclico de adenosina (ALI; KHALIL, 2015).

Ademais, a hipertensão gestacional (HAG) se distingue da PE essencialmente pela ausência da proteinúria, da lesão renal ou inclusive da endoteliose cerebral (THE AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2014). Porém, a ela se assemelha por conta do aumento da pressão arterial (igual ou acima de 140/90 mmHg) surgido após 20 semanas de gestação (HEART, 1990).

Diante do que foi supraposto, na medida em que o H₂S e o NO denotam características protetoras à disfunção endotelial, atuando, por conseguinte, no sistema cardiovascular, se pretendeu, através deste trabalho, correlacionar os níveis desses dois gases com os biomarcadores carbonil, nitrito plasmático, MDA e sFlt-1 na Gestação Saudável (GS); Hipertensão Gestacional (HAG) e Pré-Eclâmpsia (PE) para verificar a existência de diferenças entre esses grupos experimentais.

Da mesma forma que o nitrito é relevantemente estudado na função/disfunção endotelial, o sFlt-1 é um outro biomarcador plasmático bastante compreendido no contexto da PE. Logo, elucidamos de maneira tangível, a relação entre o H₂S e o NO e as possíveis associações deles com os biomarcadores plasmáticos manifestos nas desordens hipertensivas na gestação.

1.2 OBJETIVOS

Inicialmente, propomos determinar os níveis plasmáticos de H₂S nos diferentes grupos experimentais, pois somente um trabalho na literatura realizou essa dosagem (WANG et al., 2013), todavia, sem incluir a HAG. Ainda, como existem achados que demonstram um *crosstalk* entre o H₂S e o NO (ALTAANY; YANG; WANG, 2013), além de seus efeitos cardiovasculares (HOLWERDA; KARUMANCHI; LELY, 2015), quisemos avaliar o comportamento desses gases na GS, HAG e PE. Em adição, tivemos o intuito de relacionar os níveis de H₂S com os biomarcadores carbonil, MDA, nitrito plasmático e sFlt-1.

2 METODOLOGIA

Foram acompanhadas 120 pacientes com Gestação Saudável (GS), 88 com Hipertensão gestacional (HAG) e 62 com Pré-eclâmpsia (PE), sendo estas duas últimas, grupos casos e a primeira, o grupo controle. As amostras já foram coletadas no Hospital Sofia Feldman de Belo Horizonte - onde esse projeto já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - (CAAE: 01822312.0.0000.5132) e integra um estudo maior que contempla a quantificação de várias biomoléculas.

Das voluntárias que aceitaram participar deste trabalho, após esclarecimento detalhado e assinatura do termo de consentimento, foram coletados 15 mL de sangue venoso, os quais foram postos em tubos Vacutainer padrão (Becton-Dickinson) contendo EDTA. Em seguida, os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente por 10 minutos a 3200 g e alíquotas de 1000 µL foram separadas e armazenadas junto com o sangue total a -80°C até sua utilização. As amostras de plasma foram usadas para as quantificações bioquímicas.

Ademais, se relevou a inserção, na TABELA 1, da variável APGAR (Aparência, Pulso, Gesticulação, Atividade, Respiração), um índice que tem os cinco sinais vitais do recém-nascido avaliados por um pediatra e que cada um deles recebe uma pontuação de 0 a 2, assim, o somatório mínimo é 0 e máximo 10 (APGAR et al., 1958). Isso porque, de acordo com o

total da pontuação, tem-se uma ideia do estado de saúde do recém-nascido pela seguinte classificação: **1)** sem asfixia (Apgar 8 a 10); **2)** com asfixia leve (Apgar 5 a 7); **3)** com asfixia moderada (Apgar 3 a 4) ou **4)** com asfixia grave (Apgar 0 a 2) (APGAR et al., 1958; PERKINS; PAPILE, 1985).

O teste é aplicado em dois momentos diferentes (um no primeiro minuto e outro no quinto minuto após o nascimento). Notas iguais ou superiores a 7, de maneira geral, apontam normalidade; 4 a 6, indicam um baixo moderado e menores de 3 são consideradas criticamente baixas (THE AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2014).

DETERMINAÇÃO DO H₂S PLASMÁTICO

O H₂S foi mensurado pelo método da formação do azul de metileno conforme previamente demonstrado (ZHUO et al., 2009; WANG et al., 2013) com algumas modificações no protocolo. 75 µL de amostra foi misturada com 70,3 µL de solução de acetato de zinco 1% (m/v) e 4,69 µL de NaOH 10% e incubada no banho maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi incluído 75 µL de sulfato de *N*-dimetil-*p*-fenilenodiamina (NMBD) 20 mmol/L em 7,2 mmol/L HCl e 75 µL de FeCl₃ 30 µmol/L em 1,2 mmol/L de HCl.

Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, protegido da luz, se adicionou 56,25 µL de ácido tricloroacético 10% e a mistura foi centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos. A absorbância foi medida num espectrofotômetro em comprimento de onda de 670 nm. A concentração de H₂S se calculou com base em uma curva de calibração de NaHS (46,8 - 1500 µM). As amostras foram avaliadas em duplicata.

QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CARBONIL

Foram seguidos os procedimentos detalhados por Levine et al. (1990), com alterações, em que as concentrações de carbonil ligadas às proteínas foram avaliadas por meio de sua reação com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) para fornecer a hidrazona correspondente. Este produto amarelo pode ser quantificado espectrofotometricamente a 370 nm.

As amostras plasmáticas foram pipetadas em tubos de centrífuga de 1,5 ml (como no Eppendorf), e em cada um, se adicionou 500 µL de DNPH 10 mM em 2M HCl, os deixando sob repouso à temperatura ambiente durante 1 hora e usando o vórtex a cada 10 - 15 minutos.

Em seguida, foi adicionado 500 μL de ácido tricloroacético a 20% (m/v) e os tubos centrifugados a 11.000g por 3 minutos, se descartando o sobrenadante.

Os pellets foram lavados 3 vezes com 1 ml de etanol-acetato de etila (1:1) para remover o reagente livre, deixando as amostras repousarem por 10 minutos antes da centrifugação e descartando cada sobrenadante por vez. Redissolveu-se a proteína precipitada em 0,6 ml de solução de guanidina, o que levou cerca de 15 minutos à temperatura de 37°C. Qualquer material insolúvel foi removido por centrifugação. Calculou-se o teor de carbonila pela absorbância máxima (360 - 390 nm) usando um coeficiente de absorção molar de 22.000 $\text{Mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, sendo a concentração expressa como nmol carbonil/mg de proteína.

QUANTIFICAÇÃO DO MALONDIALDEÍDO

Consoante a descrição de Esterbauer; Cheeseman (1990), uma molécula de malondialdeído (MDA) reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um pigmento rosa. Para a geração deste produto foi necessário a reação se realizar em pH entre 2 a 3; a uma temperatura em torno de 90°C a 100°C e num intervalo de tempo variando de 10 a 15 min. A amostra de tecido foi misturada com dois volumes de ácido tricloroacético (TCA) frio a 10% (m/v) para precipitar a proteína.

O precipitado foi sedimentado por centrifugação e uma alíquota do sobrenadante reagiu com igual volume de 0,67% (m/v) de TBA no banho-maria em ebulição durante 10 min. Após o resfriamento, a absorbância foi lida a 532 nm.

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NITRITO

Os níveis de nitrito plasmático foram analisados por quimioluminescência como previamente descrito (SANDRIM et al., 2008). 200 μL de plasma foram injetados com solução de triiodeto acidificado em um analisador de NO por quimioluminescência (Sievers Model 280 NO Analyzer). Aproximadamente 8 mL da solução de triiodeto acidificado (2 g de iodeto de potássio e 1,3 g de iodo dissolvidos em 40 mL de água com 140 mL de ácido acético) foram colocados no recipiente no qual as amostras serão injetadas. A solução de triiodeto reduziu o nitrito a NO gasoso, o qual foi detectado pelo analisador de NO.

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE SFLT-1

As concentrações plasmáticas de sFLT-1 foram medidas com kits ELISA disponíveis no mercado (R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em duplicata e as concentrações de sFlt-1 foram calculadas a partir de uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de proteínas recombinantes.

2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa *GraphPad Prism* (versão 5.0). Como os grupos GS (n = 120) e HAG (n = 88) apresentaram nas variáveis um n total notavelmente maior que a PE (n = 62), a normalidade dos dados foi testada pelos métodos de *D'Agostino-Pearson omnibus*; de *Shapiro-Wilk* e o *Kolmogorov-Smirnov com correção de Dallal-Wilkinson-Lilliefors*. Sendo levada em conta, a quantidade de respostas negativas à distribuição gaussiana. Isto é, se as respostas “não” ao teste de normalidade fossem iguais ou superiores à metade dos dados totais, assumia-se então, um teste não paramétrico. Os dados não-paramétricos (com exceção do critério idade, expresso em média \pm desvio padrão), foram apresentados como mediana (valor mínimo ao valor máximo) nas TABELAS 1 e 2.

A comparação das variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal foi feita pelo teste de *Kruskal-Wallis* (acima de dois grupos), tendo o *Dunn's Multiple Comparison* como pós teste. As variáveis categóricas (exemplificadas pela cor, tabagismo e APGAR) foram apresentadas como número absoluto (porcentagem).

Ademais, através do *GraphPad Prism*, se geraram 3 tabelas no formato XY relativas a cada grupo - GS, HAG e PE, nas quais foram incluídos os respectivos níveis de H₂S plasmático com as seguintes variáveis de interesse: nitrito plasmático, sFlt-1, carbonil e MDA. Desse modo, foi verificado se tais parâmetros apresentam correlações significativas com o H₂S, além da exploração da regressão linear dos mesmos.

Logo, o coeficiente de *Spearman* (rs) foi utilizado para avaliar a existência de algum tipo de associação entre as variáveis contínuas selecionadas, sendo todas elas exclusivamente dados não paramétricos. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em todos os testes. Como representação simbólica, * remete a $p > 0,05$; ** a $p \leq 0,05$; *** a $p \leq 0,01$ e **** a $p \leq 0,001$.

3 RESULTADOS

Constataram-se diferenças significativas nas comparações entre a GS e a HAG e entre a GS e a PE nas variáveis clínicas IMC, pressão diastólica e sistólica (já esperadas nestas duas últimas), demonstrando como essas desordens hipertensivas na gestação possuem tais parâmetros alterados. No peso do recém-nascido; nas semanas gestacionais na coleta e no parto, houve contrastes relevantes entre a GS e a PE e entre a HAG e a PE (TABELA 1).

TABELA 1. VARIÁVEIS CLÍNICAS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Parâmetros	Gestação Saudável (n = 120)	Hipertensão Gestacional (n = 88)	Pré-Eclâmpsia (n = 62)
APGAR pontuação ao 1º minuto < 7 (%)	9,89	20,24	21,82
APGAR pontuação ao 5º minuto < 7 (%)	1,12	3,57	1,82
Cor (% de branca)	78,00	68,18	66,13
Idade (anos, média ± DV)	24,55 ± 5,66	26,23 ± 6,01	27,10 ± 6,97
IMC na gestação (kg/m²)	27,55 (19,30 - 41,60)	35,41 (23,64 - 50,23)*>	31,20 (19,38 - 45,07)*
Frequência Cardíaca (bpm)	80,00 (65,00 - 150,00)	80,00 (62,00 - 100,00)	80,00 (60,00 - 101,00)
Peso do RN (g)	3315,00 (2155,00 - 4970,00)	3160,00 (840,00 - 4350,00)>	2660,00 (445,00 - 3835,00)*
Pressão Diastólica (mmHg)	70,00 (50,00 - 90,00)	80,00 (50,00 - 110,00)*>	90,00 (65,00 - 130,00)*
Pressão Sistólica (mmHg)	110,00 (84,00 - 130,00)	130,00 (90,00 - 190,00)*	140,00 (110,00 - 200,00)*
SG na coleta	37,00 (12,00 - 40,00)	37,00 (18,00 - 43,00)>	34,00 (24,00 - 39,00)*
SG no parto (semanas)	40,00 (36,00 - 42,00)	39,00 (35,00 - 43,00)*>	37,00 (24,00 - 40,00)*
Tabagismo (% de fumantes)	11,54	14,77	14,52

TABELA 1. Os dados não paramétricos foram expressos em mediana (valor mínimo e máximo), contudo, o critério idade foi exibido no formato média ± desvio padrão. As variáveis categóricas foram apresentadas como número absoluto (porcentagem).

Parâmetros: APGAR (Aparência, Pulso, Gesticulação, Atividade, Respiração); Índice de Massa Corpórea (IMC); Semana Gestacional (SG) e RN (Recém-Nascido). Símbolos: * vs GS; > vs PE.

O método estatístico usado foi a *One-way ANOVA* (acima de dois grupos), com o teste não paramétrico *Kruskal Wallis* e o *Dunn's Multiple Comparison* como pós teste.

Pela observação da TABELA 1, evidencia-se como a HAG e a PE se distanciam de maneira significativa da GS no parâmetro do IMC ($p < 0,01$), similarmente, nesse quesito, tais desordens hipertensivas na gestação apresentam diferenças entre si ($p < 0,05$). Não obstante, as médias da pressão diastólica e sistólica dos dois grupos hipertensos se situam sobrelevadas, consideravelmente, quando comparadas às da GS ($p < 0,01$) - essas decorrências, já esperadas, possivelmente atuam como agravantes das doenças elencadas.

As semanas gestacionais no parto se diferem, sobretudo, nas comparações entre a GS e a PE e entre a HAG e a PE (ambas com $p < 0,01$) e esse padrão se repete nas semanas gestacionais na coleta. Considerando que um menor tempo de gestação interfere no desenvolvimento do feto, é compreensível por que a PE apresenta uma média de peso do recém-

nascido expressivamente abaixo da GS e da HAG (ambas com $p < 0,01$). Demonstrando, por conseguinte, uma das consequências dessa síndrome hipertensiva.

Houve pequena oscilação entre os grupos nas medições do APGAR. E, embora no primeiro minuto de vida, a porcentagem de notas inferiores a 7 tenha sido mais elevada na PE (21,82%), significa meramente que os bebês necessitam de assistências médicas e acompanhamentos temporários (HEGYI et al., 1998), já que esse numeral baixou para 1,82% na contagem posterior.

Em seguida, se elaborou a TABELA 2 para uma melhor descrição dos marcadores de estresse oxidativo carbonil e MDA, bem como dos biomarcadores nitrito plasmático e sFlt-1.

TABELA 2. MARCADORES.

Parâmetros	Gestação Saudável (n = 120)	Hipertensão Gestacional (n = 88)	Pré-Eclâmpsia (n = 62)
Carbonil (nmol/mg proteína)	2,34 (0,49 - 9,95)	1,40 (0,23 - 8,83)	1,49 (0,21 - 5,38)*
MDA (nmol/ml)	4,92 (0,28 - 9,78)	4,97 (0,77 - 12,75)	4,50 (0,30 - 9,50)
Nitrito Plasmático (nM)	130,00 (21,70 - 626,60)	75,40 (11,48 - 427,60)*	87,34 (25,72 - 222,00)*
sFlt-1 (ng/mL)	3,53 (0,69 - 9,68)	5,35 (1,00 - 16,90)	10,01 (0,32 - 30,42)*

TABELA 2. Os dados não paramétricos foram expressos em mediana (valor mínimo e máximo).

Parâmetros: Malondialdeído (MDA) e Tirosina cinase-1 solúvel em fms, do inglês *Soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1). **Símbolo:** * vs GS. O método estatístico aplicado se deu pela *One-way ANOVA*, com o teste não paramétrico *Kruskal Wallis* e o *Dunn's Multiple Comparison* como pós teste.

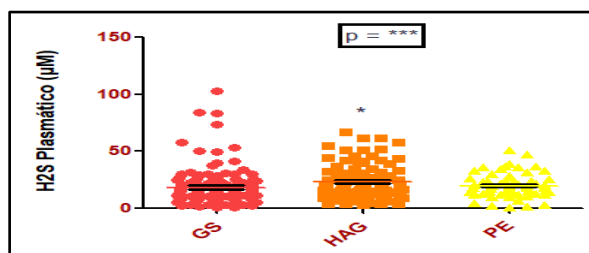
O nitrito plasmático apresentou diferença na comparação entre a GS e a HAG ($p < 0,01$) e entre a GS e a PE ($p < 0,05$). Esses fatos corroboram à inferência de que em gestações normais, os níveis de nitrito plasmático se situam mais elevados em relação às desordens na pressão arterial.

Nota-se que com exceção do MDA, um produto final da degradação lipídica oxidativa (NAIR; TURNER, 1984), todos os marcadores de estresse oxidativo da TABELA 2 apresentaram algum tipo de diferença sugestiva entre os grupos.

No parâmetro carbonil, a única discrepância observada foi na comparação entre a GS e a PE com $p > 0,05$. Quanto aos níveis de sFlt-1, eles estão bem elevados na PE, e somente esta se diferencia sobremaneira da GS nessa variável ($p < 0,01$).

A etapa seguinte se deu pela quantificação dos níveis de H_2S no plasma dos 3 grupos estudados (GRÁFICO 1). O método estatístico usado foi o *One-way ANOVA*, com o teste não paramétrico *Kruskal Wallis* com $p < 0,01$. Observamos uma diferença significativa somente entre a GS e a HAG ($p < 0,05$), especificamente no *Dunn's Multiple Comparison post test*. Isto, mesmo que as médias se assemelham entre os grupos: GS (18,48); HAG (23,44) e PE (20,00).

GRÁFICO 1 - NÍVEIS PLASMÁTICOS DE H₂S.



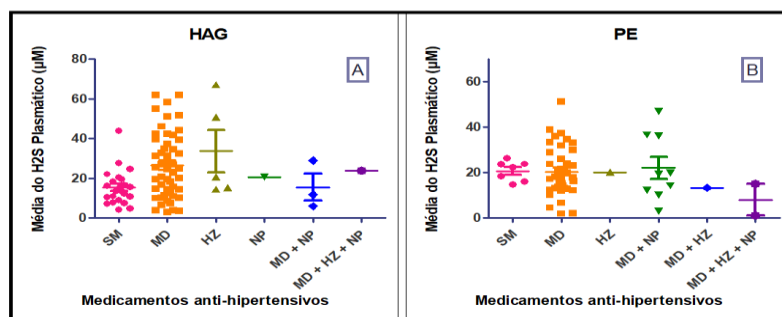
LEGENDA: Gestação Saudável (GS), Hipertensão Gestacional (HAG) e PE (Pré-Eclâmpsia). A barra dos gráficos representa a média \pm o desvio padrão. Símbolos: * vs GS e *** $p < 0,01$.

Como valores mínimos dos níveis plasmáticos de H₂S, a GS apresentou 0,75; a HAG, 2,98 e a PE, 1,03; referente aos valores máximos, a GS apresentou 102,80; a HAG, 67,17 e a PE, 51,36.

Assim, provavelmente as concentrações plasmáticas de H₂S surtem algum tipo de interferência nessas disfunções cardiovasculares.

Em prosseguimento, os anti-hipertensivos foram divididos em categorias para verificarmos se a medicação no momento da coleta modificaria os níveis plasmáticos do H₂S conforme demonstrado no GRÁFICO 2.

GRÁFICO 2. MEDICAMENTOS ANTI-HIPERTENSIVOS E NÍVEIS DE H₂S NAS DESORDENS HIPERTENSIVAS NA GESTAÇÃO.



LEGENDA: Hidralazina (HZ); Metildopa (MD); Metildopa e Hidralazina (MD + HZ); Metildopa, Hidralazina e Nifedipina (MD + HZ + NP); Metildopa e Nifedipina (MD + NP); Nifedipina (NP) e Sem medicamento (SM). A barra dos gráficos representa a média \pm o desvio padrão.

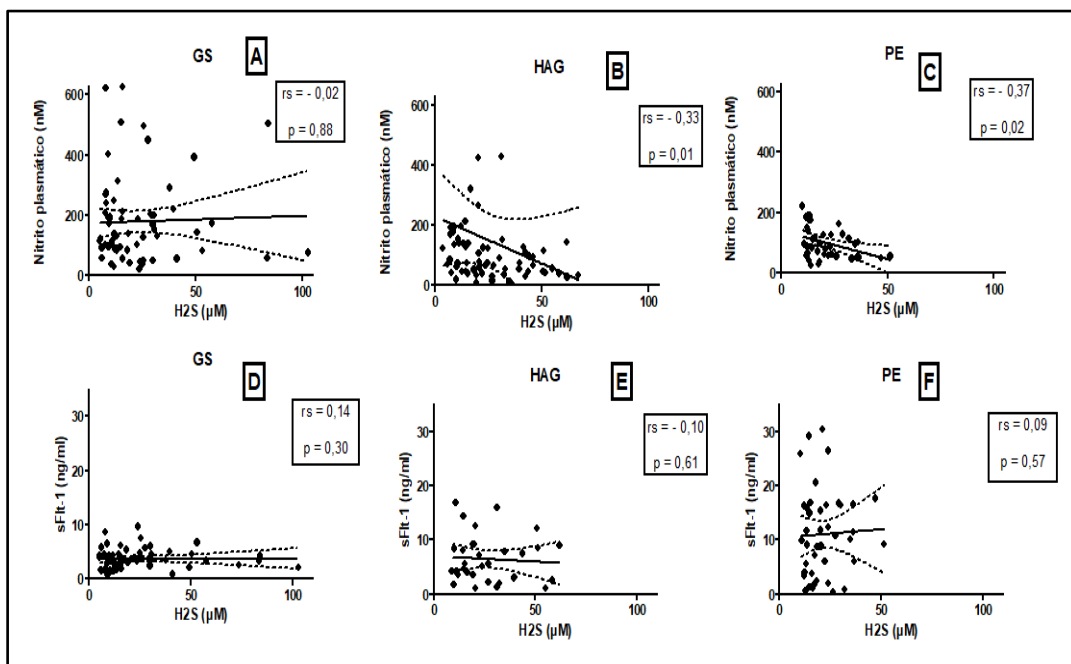
Considerando todas as categorias de medicamentos, a média das concentrações plasmáticas de H₂S na HAG variaram entre 2,98 μ M e 67,17 μ M e na PE, entre 1,03 μ M e 51,36 μ M. A metildopa, foi o medicamento mais usado em ambos os grupos [HAG, $n = 50$ (56,82 %); PE, $n = 39$ (62,90 %)]. A hidralazina, por sua vez, teve menor consumo [HAG, $n = 5$ (5,86%); PE, $n = 1$ (1,61%)]. A nifedipina obteve mais dados na combinação com a metildopa. Porém, isso só foi mais observado na PE [$n = 9$ (14,52%)], havendo uma oscilação nos números plotados (B).

Nas outras associações medicamentosas, em ambos os grupos, houve escassez de dados (GRÁFICO 2). Por fim, os valores referentes a “sem medicamento” foram mais relevantes na HAG [n = 23 (26,14%)], em que variaram entre 4,07 μ M e 43,86 μ M quanto aos níveis de H₂S no plasma (A). Todavia, na PE [n = 7 (11,29%)], variaram entre 14,72 μ M e 26,14 μ M.

Frisa-se que como a maioria das gestantes pertencentes a esses dois grupos tomam medicamentos anti-hipertensivos (hidralazina, metildopa e nifedipina) isolada ou conjuntamente, é possível que essa circunstância tenha contribuído para normalizar os números das características cardiovasculares, principalmente aqueles alusivos à frequência cardíaca (TABELA 1).

Posteriormente, algumas das categorias estudadas (nitrito plasmático, sFlt-1, MDA e carbonil) foram postas num quadro de eixo x e y juntamente com os valores de H₂S plasmático de cada grupo para descobrir quais dados possuem correlação significativa com o gasotransmissor em questão. Ademais, se acrescentou a regressão linear – representada pelo coeficiente de *Spearman* (rs) e o valor de p para assim verificar a disposição dos gráficos gerados.

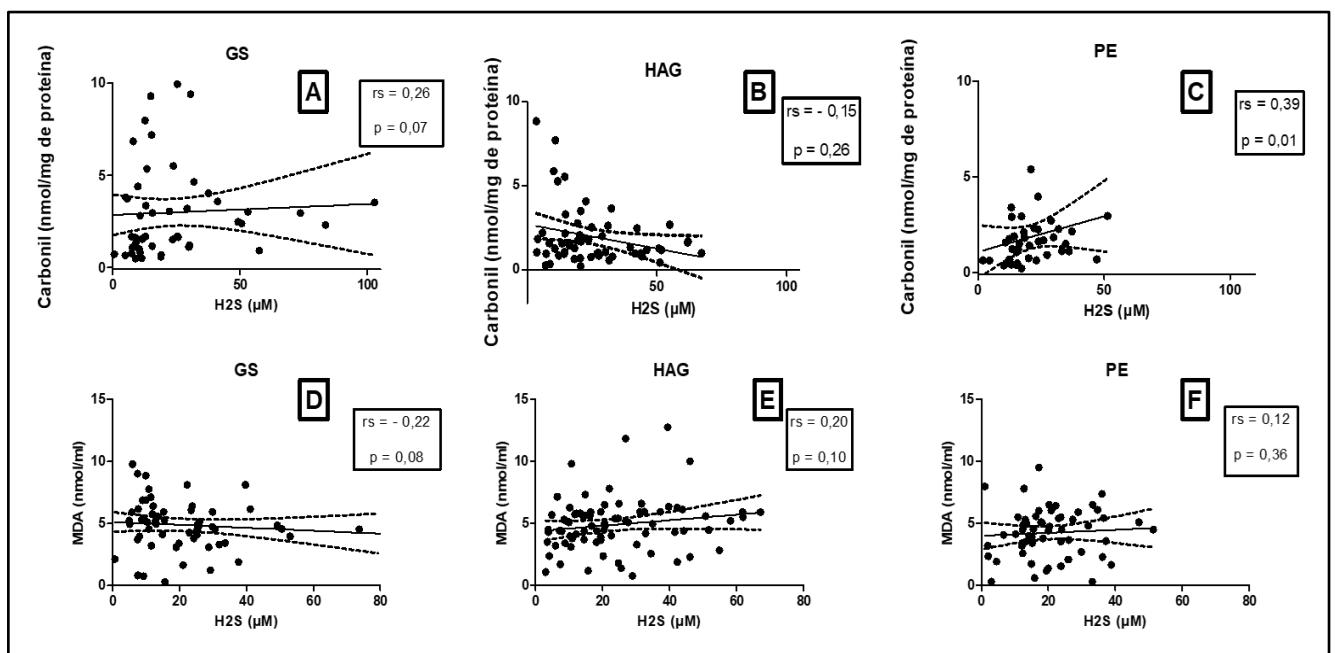
GRÁFICO 3. CORRELAÇÕES DOS NÍVEIS DE NITRITO PLASMÁTICO E SFLT-1 COM A CONCENTRAÇÃO DE H₂S NO PLASMA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.



LEGENDA: GS (Gestação Saudável); HAG (Hipertensão Gestacional) e PE (Pré-Eclâmpsia).

Referente aos níveis de nitrito plasmático, nota-se pela leitura dos gráficos (3A ao 3C), que a regressão linear de todos os grupos foi negativa, ainda, os respectivos valores da HAG ($r_s = -0,33$) e da PE ($r_s = -0,37$) são próximos. Também, as síndromes hipertensivas da gestação apresentaram correlações significativas: HAG com $p = 0,01$ (3B) e PE com $p = 0,02$ (3C). A GS (3A) teve dados mais dispersos, pois os níveis de nitrito e do H_2S plasmático se mostraram mais extensos em comparação à HAG e à PE. Nestas últimas, os dados estiveram mais concentrados no início dos eixos x e y.

GRÁFICO 4. CORRELAÇÕES DOS NÍVEIS DA CARBONIL E DO MDA COM A CONCENTRAÇÃO DE H_2S NO PLASMA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.



LEGENDA: GS (Gestação Saudável); HAG (Hipertensão Gestacional) e PE (Pré-Eclâmpsia).

Analisando o parâmetro carbonil, a GS (4A) e a PE (4C) demonstraram uma regressão linear positiva, porém só a última teve um p significativo (0,01). Na HAG e na PE, os valores obtidos se concentram nos menores níveis plasmáticos de H_2S , enquanto na GS os números referentes à carbonil se encontram mais dispersos.

Observando os gráficos gerados quanto ao MDA (4D ao 4F), a GS foi a única que apresentou uma regressão linear negativa ($r_s = -0,22$), ao mesmo tempo em que a HAG e PE apresentaram maior concentração de dados.

4 DISCUSSÃO

Pesquisas demonstraram o decréscimo dos níveis plasmáticos de H₂S ou de suas enzimas produtoras em PE (CINDROVA-DAVIES et al., 2013; WANG et al., 2013). Em contrapartida, neste trabalho, um dos nossos principais achados se deu pelos níveis do H₂S plasmático da GS se divergirem somente da HAG ($p < 0,05$) conforme observado no GRÁFICO 1. Provavelmente isso se deve a algum mecanismo compensatório dos níveis da PE, como a tensão de cisalhamento, a qual, determinada pelo fluxo sanguíneo, é uma força de tração exercida em um vetor paralelo ao eixo longo do vaso (NIEBAUER; COOKE, 1996).

Essa tensão, estimulante da fosforilação da eNOS e do aumento da síntese de NO (BOO et al., 2002), recentemente foi relatada como reguladora da expressão da CSE (YUAN et al., 2018). Assim, é possível que haja alguma associação entre as enzimas desses dois gases ao longo do fluxo de cisalhamento.

Ainda, os dados obtidos no GRÁFICO 1 levaram à hipótese de que as enzimas de H₂S, sendo constitutivas, poderiam reagir com alguma substância que diminuiria ou aumentaria a sua biodisponibilidade.

Isso porque, pesquisas já mostraram que o bloqueio da biossíntese de H₂S com inibidores farmacológicos ou o silenciamento de qualquer uma das suas enzimas produtoras [por exemplo, o silenciamento do ARN interferente pequeno (siRNA) da CSE], atenua a sinalização do VEGF e a migração das células endoteliais, bem como diminui a extensão das redes vasculares (PAPAPETROPOULOS et al., 2009; SAHA et al., 2016; KANAGY; SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017). Ao mesmo tempo em que outros achados exibiram elevação nos níveis plasmáticos de H₂S pelo uso de doadores exógenos (LI et al., 2008; LI et al., 2016).

Dessa forma, são necessárias mais investigações acerca do metabolismo desse gás para facilitar a compreensão das suas dosagens e maquinaria enzimática.

Encontramos relevantes correlações entre o H₂S do plasma: com o nitrito plasmático da HAG ($p = 0,01$) e da PE ($p = 0,02$), representadas, respectivamente, nos GRÁFICOS 3B e 3C. Ambos exibem um paralelo inversamente proporcional, corroborando com estudos que exprimiram menores níveis de nitrito plasmático na PE (SANDRIM et al., 2008; ELEUTERIO et al., 2013) e introduzindo a HAG nesse quesito, vide TABELA 2.

A PE também apresentou uma correlação significativa com a carbonil ($p < 0,01$) no GRÁFICO 4C, porém a sua regressão linear foi positiva. Isso pode ter ocorrido por conta do estresse oxidativo, todavia, ainda é incerta a sua relação com o H₂S e o NO durante a PE.

Predmore, Lefer e Gojon (2012) mostraram que o H₂S gerado *in vitro* ajuda na inibição da inflamação, no aumento da vasodilatação e na interrupção do estresse oxidativo. Este último, em exacerbação no organismo, estimula o desenvolvimento de doenças que afetam a parede do vaso, incluindo a hipertensão, a aterosclerose e complicações diabéticas vasculares (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2013). Sob outra abordagem patológica, já foram constatados baixos níveis do RNA mensageiro da CBS e da CSE nas células sanguíneas mononucleares de pacientes com doença renal crônica em comparação com indivíduos saudáveis (KUANG et al., 2018).

À vista disso, é possível que supressão dos níveis de H₂S (seja pelo seu maior consumo e/ou diminuição da sua síntese) acentue tais acometimentos.

Constatamos diferenças significativas nas comparações entre a GS e a HAG e entre a GS e a PE no parâmetro clínico IMC (TABELA 1), sugerindo que a obesidade se manifesta como um dos agravantes dessas doenças. O peso do recém-nascido apresenta diferenças nessas mesmas comparações, indicando que essa variável é alterada pelo contexto das desordens hipertensivas na gestação.

Sabendo-se que o sFlt-1 tem propriedades antiangiogênicas (KENDALL; WANG; THOMAS, 1996; SHIBUYA, 2001), o contraste expressivo que encontramos entre a GS e a PE quanto aos seus valores, entra em concordância com pesquisas (ROBERTS, 1998; SANDRIM et al., 2008; NOORI et al., 2010). E na literatura, outros resultados o relacionam com o H₂S: nas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), o silenciamento do RNA codificante para a CSE com siRNA elevou a produção do sFlt-1, enquanto que a superexpressão de CSE através de adenovírus recombinante codificando CSE humana diminuiu os níveis de sFlt-1 sintetizado pelas HUVECs (WANG et al., 2013).

Relativamente aos medicamentos anti-hipertensivos, a metildopa, um inibidor adrenérgico de ação central atuante na redução do tônus simpático (KOHLMANN JR. et al., 2010), foi o mais usado pelos dois grupos (GRÁFICO 2). Demonstrando, por conseguinte como provavelmente é o que exhibe melhores efeitos farmacológicos, reafirmando, portanto, a sua experiência favorável em relação à segurança do binômio materno-fetal, conforme descrito no Jornal Brasileiro de Nefrologia (KOHLMANN JR. et al., 2010).

Nesta monografia, a metodologia usada para mensurar o H₂S no plasma foi feita pela formação do azul de metileno consoante previamente descrito (ZHUO et al., 2009; WANG et al., 2013). Todavia, possui como limitação a possível superestimação da concentração do H₂S pelas espécies derivadas do NMBD (TSIKAS; COOPER, 2014). Também, como os valores absolutos na determinação do H₂S são relevantes à sua fisiologia endógena e à dose exata de

seus doadores para sistemas biológicos (WANG et al., 2014), a ausência desses aspectos é prejudicial.

Ainda, por mais que apresentem resultados divergentes, existem protocolos distintos para medir o gasotransmissor em questão, tais quais: “uma derivatização espectrofotométrica resultando na formação de azul de metileno; variações deste por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); eletrodos íon-seletivos de sulfeto; sensores polarográficos; cromatografia gasosa e a HPLC em conjunto com soluções baseadas em métodos de fluorimetria usando monobromobimane para derivatizar H₂S livre” (SHEN et al., 2012).

Experimentos implicando na remoção do endotélio ou expondo o L-NAME, um inibidor não-seletivo da NOS, a anéis isolados da artéria aorta de ratos, diminuiu o efeito vasorelaxante de ambos os doadores do H₂S - o NaHS (de liberação rápida) e o GYY3147 (de liberação lenta) (LI et al., 2008). Em complemento, já foi relatado que o H₂S promoveu a fosforilação da eNOS em células endoteliais e portanto, aumentou a síntese de NO (ALTAANY; YANG; WANG, 2013). Por outro lado, a inibição de CSE diminuiu a biodisponibilidade de NO (ALTAANY; YANG; WANG, 2013). Logo, de maneira expressiva, estudos demonstram o *crossstalk* entre esses dois gases.

No tocante aos dados obtidos em outros modelos que relacionem a PE com o H₂S, os efeitos *in vivo* deste último tiveram explicações prévias. O uso de um inibidor da enzima CSE, a DL-propargilglicina (PAG), provocou aumento da pressão arterial média em camundongos prenhes, assim como, a elevação nos níveis plasmáticos de sFlt-1 (WANG et al., 2013). Ainda, tratamento com doador de H₂S reverteu a elevação da pressão arterial em ratas e camundongos prenhes com um fenótipo *preeclampsia-like* (WANG et al., 2013; HOLWERDA et al., 2014; POSSOMATO-VIEIRA et al., 2016).

Quanto aos resultados de outros tipos de ensaios, a inibição da atividade da CSE pela PAG reduziu a produção do PIGF no primeiro trimestre gestacional ($p = 0.003$), bem como impossibilitou a invasão de trofoblastos *in vitro* nas mulheres pré-eclâmplicas (WANG et al., 2013). À vista disso, essas decorrências enfatizam o papel homeostático do H₂S.

CONCLUSÃO

Com os nossos resultados, sugerimos que o H₂S e o NO se interrelacionam com os biomarcadores carbonil, sFlt-1 e o nitrito plasmático nas desordens hipertensivas da gestação. Tendo em vista pelo que foi discutido, a HAG se insere num contexto de disfunção endotelial e conseqüente estresse oxidativo, similarmente à PE. Todavia, este último grupo possui seus respectivos níveis e biodisponibilidade de H₂S e NO alterados, possivelmente, pelo mecanismo da tensão de cisalhamento. Portanto, esses dois gasotransmissores desempenham papéis fundamentais no sistema cardiovascular. E para um maior entendimento das dosagens do H₂S e de sua maquinaria enzimática são necessárias mais investigações sobre o seu metabolismo.

5 REFERÊNCIAS

- AHMED, A. Molecular mechanisms and therapeutic implications of the carbon monoxide/hmox1 and the hydrogen sulfide/CSE pathways in the prevention of pre-eclampsia and fetal growth restriction. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 243–244, 2014.
- ALI, S. M.; KHALIL, R. A. Genetic, immune and vasoactive factors in the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 1495–1515, 2015.
- ALI, M. Y.; WHITEMAN, M.; LOW, C. M.; MOORE, P. K. Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATP channel-dependent pathway. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 195, n. 1, p. 105–112, 2007.
- ALTAANY, Z.; YANG, G.; WANG, R. Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 879–88, 2013.
- APGAR, V.; HOLADAY, D. A.; JAMES, L. S.; WEISBROT, I. M.; BERRIEN, C. Evaluation of the newborn infant; second report. **Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 168, n. 15, p. 1985–8, 1958.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 272, n. 33, p. 20313–20316, 1997.
- BOO, Y. C.; HWANG, J.; SYKES, M.; MICHELL, B. J.; KEMP, B. E.; LUM, H.; JO, H. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser 635 by a protein kinase A-dependent mechanism. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 283, n. 5, p. H1819–H1828, 2002.
- CINDROVA-DAVIES, T.; HERRERA, E. A.; NIU, Y.; KINGDOM, J.; GIUSSANI, D. A.; BURTON, G. J. Reduced Cystathionine γ -Lyase and Increased miR-21 Expression Are Associated with Increased Vascular Resistance in Growth-Restricted Pregnancies. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 182, n. 4, p. 1448–1458, 2013.
- DE GROOT, C. J. M.; TAYLOR, R. N. New Insights into the Etiology of Pre-eclampsia. **Annals of Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 243–249, 1993.
- DEKKER, G. A.; SIBAI, B. M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 179, n. 5, p. 1359–1375, 1998.
- ELEUTERIO, N. M.; PALEI, A. C. T.; RANGEL MACHADO, J. S.; TANUS-SANTOS, J. E.; CAVALLI, R. C.; SANDRIM, V. C. Relationship between adiponectin and nitrite in healthy and preeclampsia pregnancies. *Clinica chimica acta*; **international journal of clinical chemistry**, [s. l.], v. 423, p. 112–5, 2013.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, [s. l.], v. 186, p. 407–21, 1990.

HEART, N. **Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy**. [s. l.], p. 1–22, 1990.

HEGYI, T.; CARBONE, T.; ANWAR, M.; OSTFELD, B.; HIATT, M.; KOONS, A.; PINTO-MARTIN, J.; PANETH, N. The Apgar Score and Its Components in the Preterm Infant. **Pediatrics**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 77–81, 1998.

HÖGBERG, U. The World Health Report 2005: “Make every mother and child count” - Including Africans. **Scandinavian journal of public health**, v. 33, p. 409-11, 2005.

HOLWERDA, K. M.; BURKE, S. D.; FAAS, M. M.; ZSENGELLER, Z.; STILLMAN, I. E.; KANG, P. M.; VAN GOOR, H.; MCCURLEY, A.; JAFFE, I. Z.; KARUMANCHI, S. A.; LELY, A. T. Hydrogen sulfide attenuates sFlt1-induced hypertension and renal damage by upregulating vascular endothelial growth factor. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 717–25, 2014.

HOLWERDA, K. M.; KARUMANCHI, S. A.; LELY, A. T. Hydrogen sulfide: Role in vascular physiology and pathology. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 170–176, 2015.

HU, T.; WANG, G.; ZHU, Z.; HUANG, Y.; GU, H.; NI, X. Increased ADAM10 expression in preeclamptic placentas is associated with decreased expression of hydrogen sulfide production enzymes. **Placenta**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 947–950, 2015.

KANAGY, N. L.; SZABO, C.; PAPAPETROPOULOS, A. Vascular biology of hydrogen sulfide. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, [s. l.], v. 312, n. 5, p. C537–C549, 2017.

KENDALL, R. L.; WANG, G.; THOMAS, K. A. Identification of a Natural Soluble Form of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, FLT-1, and Its Heterodimerization with KDR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 226, n. 2, p. 324–328, 1996.

KIMURA, Y.; KOIKE, S.; SHIBUYA, N.; LEFER, D.; OGASAWARA, Y.; KIMURA, H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces potential redox regulators cysteine- and glutathione-persulfide (Cys-SSH and GSSH) together with signaling molecules H₂S₂, H₂S₃ and H₂S. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 10459, 2017.

KOHLMANN, JR., O.; GUS, M.; RIBEIRO, A. B.; VIANNA, D.; COELHO, E. B.; BARBOSA, E.; ALMEIDA, F. A.; FEITOSA, G.; MORENO, H.; GUIMARÃES, J. I.; RIBEIRO, J. P.; RAMIREZ, J. A. F.; MARTINS, J. F. V.; SANTOS, R. A. S. Dos. Tratamento medicamentoso. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, [s. l.], v. 32, p. 29–43, 2010.

KUANG, Q.; XUE, N.; CHEN, J.; SHEN, Z.; CUI, X.; FANG, Y.; DING, X. Low Plasma Hydrogen Sulfide Is Associated with Impaired Renal Function and Cardiac Dysfunction. **American Journal of Nephrology**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 361–371, 2018.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods in Enzymology**, [s. l.], 1990.

LI, L.; ROSE, P.; MOORE, P. K. Hydrogen Sulfide and Cell Signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 169–187, 2011.

LI, N.; WANG, M.-J.; JIN, S.; BAI, Y.-D.; HOU, C.-L.; MA, F.-F.; LI, X.-H.; ZHU, Y.-C. The H₂S Donor NaHS Changes the Expression Pattern of H₂S-Producing Enzymes after Myocardial Infarction. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 1–11, 2016.

LI, L.; WHITEMAN, M.; GUAN, Y. Y.; NEO, K. L.; CHENG, Y.; LEE, S. W.; ZHAO, Y.; BASKAR, R.; TAN, C. H.; MOORE, P. K. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. **Circulation**, [s. l.], v. 117, n. 18, p. 2351–2360, 2008.

MAYNARD, S. E.; MIN, J.-Y.; MERCHAN, J.; LIM, K.-H.; LI, J.; MONDAL, S.; LIBERMANN, T. A.; MORGAN, J. P.; SELLKE, F. W.; STILLMAN, I. E.; EPSTEIN, F. H.; SUKHATME, V. P.; KARUMANCHI, S. A. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1(sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 111, n. 5, p. 649–658, 2003.

MUSTAFA, A. K.; SIKKA, G.; GAZI, S. K.; STEPPAN, J.; JUNG, S. M.; BHUNIA, A. K.; BARODKA, V. M.; GAZI, F. K.; BARROW, R. K.; WANG, R.; AMZEL, L. M.; BERKOWITZ, D. E.; SNYDER, S. H. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. **Circulation Research**, [s. l.], v. 109, n. 11, p. 1259–1268, 2011.

NAIR, V.; TURNER, G. A. The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: Structure of the adduct with malondialdehyde. **Lipids**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 804–805, 1984.

NIEBAUER, J.; COOKE, J. P. Cardiovascular effects of exercise: Role of endothelial shear stress. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 1652–1660, 1996.

NOORI, M.; DONALD, A. E.; ANGELAKOPOULOU, A.; HINGORANI, A. D.; WILLIAMS, D. J. Prospective Study of Placental Angiogenic Factors and Maternal Vascular Function Before and After Preeclampsia and Gestational Hypertension. **Circulation**, [s. l.], v. 122, n. 5, p. 478–487, 2010.

PAAUW, N. D.; LELY, A. T. Cardiovascular Sequels During and After Preeclampsia. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l: s.n.]. v. 1065p. 455–470, 2018.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, [s. l.], v. 333, n. 6174, p. 664–666, 1988.

PALMER, R. M.; MONCADA, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 348–52, 1989.

PAPAPETROPOULOS, A.; PYRIOCHOU, A.; ALTAANY, Z.; YANG, G.; MARAZIOTI, A.; ZHOU, Z.; JESCHKE, M. G.; BRANSKI, L. K.; HERNDON, D. N.; WANG, R.; SZABÓ, C. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 51, p. 21972–21977, 2009.

PERKINS, R. P., PAPILE, L.A. The very low birth weight infant: incidence and significance of low Apgar scores, “asphyxia,” and morbidity. Findings at delivery. **American Journal of Perinatology**, v. 2, p.108–113, 1985.

POSSOMATO-VIEIRA, J. S.; GONÇALVES-RIZZI, V. H.; GRAÇA, T. U. S.; NASCIMENTO, R. A.; DIAS-JUNIOR, C. A. Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats. **Naunyn-Schmiedeberg’s archives of pharmacology**, [s. l.], v. 389, n. 12, p. 1325–1332, 2016.

POSSOMATO-VIEIRA, J. S.; KHALIL, R.A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. **Advances in pharmacology**, v. 77; p. 361-431, 2016.

PREDMORE, B. L.; LEFER, D. J.; GOJON, G. Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 119–140, 2012.

ROBERTS, J. Endothelial Dysfunction in Preeclampsia. **Seminars in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 01, p. 5–15, 1998.

SAHA, S.; CHAKRABORTY, P. K.; XIONG, X.; DWIVEDI, S. K.; MUSTAFI, S. B.; LEIGH, N. R.; RAMCHANDRAN, R.; MUKHERJEE, P.; BHATTACHARYA, R. Cystathionine-synthase regulates endothelial function via protein S-sulfhydration. **Faseb Journal**, v. 30, p. 441–456, 2016.

SÁNCHEZ-ARANGUREN, L. C.; PRADA, C. E.; RIAÑO-MEDINA, C. E.; LOPEZ, M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. **Frontiers in physiology**, [s. l.], v. 5, p. 372, 2014.

SANDRIM, V. C.; PALEI, A. C. T.; METZGER, I. F.; GOMES, V. A.; CAVALLI, R. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Nitric Oxide Formation Is Inversely Related to Serum Levels of Antiangiogenic Factors Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 and Soluble Endogline in Preeclampsia. **Hypertension**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 402–407, 2008.

SHEN, X.; PETER, E. A.; BIR, S.; WANG, R.; KEVIL, C. G. Analytical measurement of discrete hydrogen sulfide pools in biological specimens, **Elsevier Inc.**, 2012.

SHIBUYA, M. Structure and Function of VEGF/VEGF-receptor System Involved in Angiogenesis. **Cell Structure and Function**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 25–35, 2001.

TANZ, L. J.; STUART, J. J.; MISSMER, S. A.; RIMM, E. B.; SUMNER, J. A.; VADNAIS, M. A.; RICH-EDWARDS, J. W. Cardiovascular biomarkers in the years following pregnancies complicated by hypertensive disorders or delivered preterm. **Pregnancy Hypertension**, [s. l.], v. 13, p. 14–21, 2018.

TARAVATI, A.; TOHIDI, F. Comprehensive analysis of oxidative stress markers and antioxidants status in preeclampsia. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 779–790, 2018.

THE AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Executive summary: Neonatal encephalopathy and neurologic outcome, second edition. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Neonatal Encephalopathy. **Obstetrics & Gynecology**, [s. l.], v. 123, n. 4, p. 896–901, 2014.

TSIKAS, D.; COOPER, A. J. L. Letter by Tsikas and Cooper Regarding Article, “Dysregulation of Hydrogen Sulfide (H₂S) Producing Enzyme Cystathionine γ -lyase (CSE) Contributes to Maternal Hypertension and Placental Abnormalities in Preeclampsia”. **Circulation**, [s. l.], v. 129, n. 22, 2014.

WANG, K.; AHMAD, S.; CAI, M.; RENNIE, J.; FUJISAWA, T.; CRISPI, F.; BAILY, J.; MILLER, M. R.; CUDMORE, M.; HADOKÉ, P. W. F.; WANG, R.; GRATACÓS, E.; BUHIMSCHI, I. A.; BUHIMSCHI, C. S.; AHMED, A. Dysregulation of Hydrogen Sulfide Producing Enzyme Cystathionine γ -lyase Contributes to Maternal Hypertension and Placental Abnormalities in Preeclampsia. **Circulation**, [s. l.], v. 127, n. 25, p. 2514–2522, 2013.

WANG, K.; AHMAD, S.; CAI, M.; RENNIE, J.; FUJISAWA, T.; CRISPI, F.; BAILY, J.; MILLER, M. R.; CUDMORE, M.; HADOKÉ, P. W. F.; WANG, R.; GRATACÓS, E.; BUHIMSCHI, I. A.; BUHIMSCHI, C. S.; AHMED, A. Response to letter regarding article, “dysregulation of hydrogen sulfide (H₂S) producing enzyme cystathionine γ -lyase (CSE) contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia”, **Lippincott Williams and Wilkins**, 2014.

WANG, L.; YANG, T.; DING, Y.; ZHONG, Y.; YU, L.; PENG, M. Chemerin plays a protective role by regulating human umbilical vein endothelial cell-induced nitric oxide signaling in preeclampsia. **Endocrine**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 299–308, 2015.

WU, L.; WANG, R.; LI, H.; YANG, G.; FU, M.; ZHANG, W. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 8, p. 2943–2948, 2012.

YUAN, S.; YURDAGUL, A.; PERETIK, J. M.; ALFAIDI, M.; AL YAFEAI, Z.; PARDUE, S.; PEARSON, B. H.; KEVIL, C. G.; ORR, A. W. Cystathionine γ -lyase modulates flow-dependent vascular remodeling. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 2126–2136, 2018.

ZHUO, Y.; CHEN, P.-F.; ZHANG, A.-Z.; ZHONG, H.; CHEN, C.-Q.; ZHU, Y.-Z. Cardioprotective Effect of Hydrogen Sulfide in Ischemic Reperfusion Experimental Rats and Its Influence on Expression of Survivin Gene. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 1406–1410, 2009.