Isis Paloppi Corrêa

**Expressão gênica de fatores angiogênicos na
placenta de ratas submetidas ao estresse**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Dr. Rodrigo Ruano

**São Paulo
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Corrêa, Isis Paloppi

Expressão gênica de fatores angiogênicos na placenta de ratas submetidas ao estresse / Isis Paloppi Corrêa. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia.

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Rodrigo Ruano.

Descritores: 1.Estresse 2.Placentação 3.Fator angiogênico 4.Modelos animais

USP/FM/SBD-050/09

“Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

“A meu pai (Angelo), mãe (Mariza) e irmão (Átila). A esta maravilhosa família pela sólida formação, pelo carinho, incentivo e paciência, que me proporcionaram muita força para a realização deste trabalho. Meus eternos agradecimentos a vocês, que são essenciais em minha vida.”

“Ao noivo ímpar (Ricardo) que tive a felicidade ter encontrado. Obrigado por todo apoio, carinho, compreensão e principalmente por toda paciência que possuí de forma tão espontânea.”

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Ruano, pela confiança depositada em meu trabalho. Obrigado por sempre demonstrar acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela orientação e principalmente pelo bom convívio, simples palavras fazem toda a diferença nos momentos mais difíceis. Agradeço também a liberdade de ação que me permitiu, contribuindo muito para o meu desenvolvimento pessoal.

AGRADECIMENTOS

Ao Profº Marcelo Zugaib por permitir as condições necessárias para a realização da pesquisa. Obrigado por tudo.

Durante a experiência do doutorado, encontramos diversas pessoas e algumas são extremamente marcantes como a Profª Estela Bevilacqua. O meu muito obrigado pelo conhecimento científico e grande experiência que você faz fluir a sua volta, pelas críticas que me fizeram crescer e aprender, por estar sempre disposta a ouvir e auxiliar, pelo carinho, pela paciência e por esta extensa dedicação ao trabalho científico, minha eterna admiração e gratidão.

A Drª.Rossana Pulcinelli Vieira Francisco e ao departamento de pós-graduação da Obstetrícia por aceitar minha transferência. Obrigado.

Ao departamento de citofisiologia do trofoblasto do instituto de ciências biomédicas onde encontrei pessoas maravilhosas, que me receberam com muita cordialidade e disposição em auxiliar no que fosse preciso.

A Profª Consuelo Junqueira Rodrigues pela oportunidade oferecida que me permitiu grande aprendizado.

As pessoas com quem convivo no LIM57. Um dos melhores locais que já encontrei para trabalhar, com pessoas singulares como Dr. Nilton, sempre atencioso com relação as minhas várias dúvidas, sempre aberto a discussões. Ainda dentro do departamento, umas das pessoas que mais estiveram ao meu lado: querida amiga Salet, sempre presente nos momentos de muita alegria e nos de extrema dificuldade, não tenho palavras

para descrever estes anos de convívio. A querida amiga Keila pelo carinho, amizade e auxílio nas etapas finais da tese. Agradeço a Deus por me permitir ter sempre pessoas muito especiais como vocês no dia-a-dia. Meu eterno carinho.

A amiga Keila Prado pelo auxílio nos retoques finais da tese.

A Lúcia, Fátima, Flávia, Lillian pelo auxílio técnico necessário para a realização de parte deste trabalho e pelo desprendimento de conhecimento de forma tão cortês.

A todas as pessoas do administrativo que sempre podemos contar como Inês, Soraia, Márcia, Fátima, Alan, Willian e Marina. Agradeço por toda ajuda e amizade.

As ratas, que tem sua vida doada a pesquisa para o entendimento e compreensão dos processos fisiológicos, para que o conhecimento humano evolua. Suas valiosas vidas podem aliviar o sofrimento de várias outras. Meu muito obrigado.

Ao LIM57 pelo suporte financeiro essencial, sem o qual, não seria possível a realização deste trabalho.

E finalmente a Deus por sempre me iluminar e me guiar...

Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso. A todos que cruzaram meu caminho, agradeço profundamente, e dedico o resultado do trabalho.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1	Processo de implantação e placentação normal em ratas	9
2.2	Modelos de estresse em rato	12
2.3	Fatores angiogênicos	18
2.3.1	Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)	18
2.3.2	Receptor 1 de VEGF (VEGFR-1)	20
2.3.3	Receptor 2 de VEGF (VEGFR-2)	21
2.3.4	Fator de crescimento placentário (PIGF)	23
2.3.5	Fator induzido por hipoxia 1 α (HIF-1 α)	24
2.4	Angiogênese na placenta de roedores	25
3	OBJETIVOS.....	28
4	MÉTODOS.....	30
4.1	Casuística.....	31
4.1.1	Acasalamento.....	32
4.1.2	Formação dos grupos de animais	32
4.1.2.1	Grupo 1.....	32
4.1.2.2	Grupo 2.....	33
4.2	Modelo experimental de estresse.....	34
4.2.1	Estresse crônico e agudo	34
4.2.2	Sacrifício e obtenção das placentas	35
4.3	Reagentes, abreviaturas e procedência	35
4.4	Análise das amostras placentárias	36
4.4.1	Armazenamento das placentas para análise histológica	36
4.4.2	Armazenamento das placentas para extração de RNA	37

4.5	Análise histológica	37
4.5.1	Preparo do tecido	37
4.5.2	Coloração pela hematoxina e eosina (HE)	38
4.6	Desenho dos iniciadores (<i>primers</i>)	38
4.7	Extração do RNA	40
4.7.1	Determinação da integridade e quantidade de RNA total....	41
4.7.2	Síntese de cDNA	41
4.7.3	Técnica de PCR (polymerase chain reaction)	42
4.8	Seqüenciamento.....	43
4.8.1	Purificação de cDNA	43
4.8.2	Re-amplificação de DNA purificado	44
4.8.3	Seqüenciamento de DNA	45
4.8.4	Precipitação da reação de seqüenciamento utilizando glicogênio	46
4.9	Análise da expressão gênica	48
4.9.1	Quantificação da expressão gênica de PIGF, VEGFA, VEGFR-1, VEGFR-2 e HIF-1 α	48
4.9.2	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.....	48
4.10	Análise estatística.....	52
5	RESULTADOS	54
5.1	Avaliação dos parâmetros gestacionais	55
5.1.1	Avaliação do peso materno	55
5.1.2	Avaliação dos pesos placentário e fetal.....	57
5.2	Análises Histológicas.....	60
5.3	Expressão gênica das placentas	63
6	DISCUSSÃO.....	68
7	CONCLUSÕES.....	78
8	ANEXOS.....	80
9	REFERÊNCIAS	84

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
PIGF	fator de crescimento placentário
VEGFR-1	receptor 1 do fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR-2	receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular
HIF	fator induzido por hipoxia
DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RNase	enzima que degrada o ácido ribonucléico
Dnase	enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
PCR	reação em cadeia pela polimerase
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
et al.....	e outros
dB	decibel
min.....	minutos
cm.....	centímetro
°C	grau Celsius
mL	mililitro
g	grama
CO ₂	dióxido de carbono
M	Molar
pH.....	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto

μm micrometro
 μg micrograma
q.s.p.....quantidade suficiente para
mMmiliMolar
Vvolts
U/ μLunidade por microlitro
mgmiligrama
s.....segundos
ng nanograma
pmoles/ μL pico moles por microlitro
hhora
 ∞ infinito
=igual a
<menor do que
>maior do que

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cronograma de estímulo realizado nas ratas prenhes do grupo prenhe-estressado.....	33
Figura 2 - Cronograma de procedimentos das ratas do grupo prenhe-controle	33
Figura 3 - Análise do material obtido por eletroforese em gel de agarose.....	45
Figura 4 - Curva de <i>melting</i>	51
Figura 5 - Representação gráfica, tipo <i>Box-plot</i> , do ganho de peso materno entre os grupos estudados.	56
Figura 6 - Representação gráfica, tipo <i>Box-plot</i> , dos valores obtidos para o peso fetal	57
Figura 7 - Representação gráfica, tipo <i>Box-plot</i> , dos valores obtidos para o peso placentário	58
Figura 8. Representação gráfica, tipo <i>Box-plot</i> , da razão peso placenta/feto	59
Figura 9 - Placenta de 20 dias de gestação de rata do grupo controle.	61
Figura 10 - Placenta de 20 dias de gestação de rata do grupo estresse.	62
Figura 11 - Representação gráfica, tipo <i>Box-plot</i> , da expressão do gene VEGF-A.....	63
Figura 12 - Representação gráfica, tipo <i>Box-plot</i> , da expressão do gene VEGFR-1..	64
Figura 13 - Representação gráfica, tipo <i>Box-plot</i> , da expressão do gene VEGFR-2.	65
Figura 14 - Representação gráfica, tipo <i>Box-plot</i> , da expressão do gene PIGF.....	66
Figura 15 - Representação gráfica, tipo <i>Box-plot</i> , da expressão do gene HIF-1 α	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variações que podem ser amplificadas com o <i>primer</i> de VEGF-A.	47
Tabela 2 - Peso materno.	55
Tabela 3 - Ganho de peso materno.	56
Tabela 4 - Peso fetal.	57
Tabela 5 - Peso placentário.	58
Tabela 6 - Razão entre o peso placentário e fetal	59
Tabela 7 - Expressão do gene VEGF-A.	63
Tabela 8 - Expressão do gene VEGFR-1.	64
Tabela 9 - Expressão do gene VEGFR-2.	65
Tabela 10 - Expressão do gene PIGF.	66
Tabela 11 - Expressão do gene HIF-1 α	67

RESUMO

Corrêa IP. *Expressão gênica de fatores angiogênicos na placenta de ratas submetidas ao estresse* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 109p.

Objetivos: Avaliar a influencia do estresse sobre os pesos maternos, placentários e fetais, as alterações histológicas placentárias e a expressão gênica dos fatores angiogênicos em ratas prenhes. **Métodos:** De setembro de 2007 a julho de 2008, foi realizado um estudo experimental do tipo caso-controle, em que 6 ratas prenhes foram submetidas a estímulos estressantes crônicos e agudos enquanto que 6 animais constituíram o grupo controle. No 20º dia de prenhez, todas as ratas foram sacrificadas. Os seguintes dados foram analisados e comparados entre os grupos: a. pesos maternos, placentários e fetais; b. alterações histológicas placentárias; e, c. expressão gênica dos fatores angiogênicos (VEGF-A e PlGF), dos seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) e do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α). **Resultados:** Os pesos maternos, placentários e fetais foram significativamente menores no grupo de ratas prenhes-estressadas em relação ao controle. Histologicamente foram encontradas a presença de núcleos picnóticos no grupo prenhe-estressado. Observou-se expressão gênica significativamente maior de VEGF-A no grupo rata prenhe-estressada assim como redução significativa da expressão gênica de PlGF, VEGFR-1, VEGFR-2, quando comparadas ao controle. Não houve alterações entre os grupos para o gene HIF-1 α . **Conclusões:** No modelo animal de estresse estudado, observou-se alterações significativas no peso placentário e da expressão gênica dos fatores angiogênicos placentários em ratas submetidas ao estresse.

Descritores: 1.Estresse 2.Placentação 3.Fator angiogênico 4.Modelos animais.

SUMMARY

Corrêa IP. *Expression of the angiogenic factors in the placenta of stressed rats*. [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 109p.

Objectives: to evaluate the influence of the stress on the maternal, placental and fetal weights, on the histological findings and on the genetic expression of the angiogenic factors in pregnant rats. **Methods:** From September 2007 to July 2008, an experimental case-control study was conducted in which 6 pregnant rats were submitted to chronic and acute stress while six other were considered as controls. In the 20th day of gestation, all animals were sacrificed. The following data were evaluated and compared between both groups: a. maternal, placental and fetal weights; b. histological findings; and c. genetic expression of angiogenic factors (VEGF-A and PlGF), receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) and hypoxic-induced factor (HIF-1 α). **Results:** Maternal, placental and fetal weights were statistically smaller in the stressed animals comparing to controls. Histological analysis revealed picnotic nuclei in the placentas of stressed rats. A statistically significant increase in the genetic expression of VEGF-A as well as a reduction of the expression of the PlGF, VEGFR-1, VEGFR-2 were observed in the placentas of the stressed group in comparison to controls. There was no difference of expression of the gene HIF-1 α between both groups. **Conclusions:** In the present animal model of stress, significant alterations in the placental weights, histology and genetic expression of the angiogenic factors among pregnant rats under stress.

Descriptors: 1.Stress 2.Placentation 3.Angiogenic factor 4.Animals models

1 INTRODUÇÃO

Uma gestação saudável depende de eventos adequadamente coordenados envolvendo os organismos da mãe e do produto da concepção, o que provoca como resultado invasão trofoblástica e placentação adequada. As funções placentárias incluem, principalmente, a produção de hormônios, a transferência de nutrientes da mãe para o feto, o aporte suficiente de oxigênio, a eliminação de resíduos do metabolismo fetal e imunoregulação. A formação desta estrutura é um processo dinâmico e fundamental para a manutenção e proteção do desenvolvimento embrionário/fetal, que se inicia muito precocemente nas primeiras fases da implantação embrionária (Regnault et al., 2002; Cross, 2006).

O estabelecimento e funcionamento da placenta também dependem de uma adequada vascularização na interface materno-fetal e placentária. Os processos de vasculogênese e angiogênese placentária são controlados por diversas moléculas pró- e anti-angiogênicas ou ainda pela inibição da atividade de seus receptores específicos (Norrby, 1997; Breier, 2000). No caso de inibição da atividade angiogênica observa-se a desestabilização da parede vascular e a inibição da migração e da proliferação das células endoteliais e de seus precursores (Janota et al., 2003). Destacam-se, principalmente, entre os fatores de angiogênicos, o VEGF-A (fator de crescimento vascular endotelial) e o PlGF (fator de crescimento placentário) (Vuorela et al., 1997).

Dentre os muitos fatores envolvidos na migração do trofoblasto até as artérias espiraladas e invasão destes componentes vasculares decíduais, a expressão de moléculas de adesão e de degradação da matriz extracelular pelo trofoblasto e a expressão de fatores angiogênicos e de moléculas imunoreguladoras na interface materno-placentária possuem papel de relevância. Algumas doenças, como, por exemplo, a pré-eclâmpsia, são caracterizadas pela invasão trofoblástica inadequada e os fatores que não regulam satisfatoriamente este processo durante a placentação, como os de crescimento e aqueles regulatórios da angiogênese e vasculogênese, podem ser considerados candidatos em potencial no processo fisiopatológico destas enfermidades (Goldman-Wohl e Yagel, 2002).

Estudos em ratas prenhes demonstraram processos de invasão trofoblástica e remodelação das artérias uterinas (placentação) semelhantes às aquelas observadas em seres humanos (Ain et al., 2003; Caluwaerts et al., 2005). Assim, esse modelo animal se torna interessante para pesquisar e estudar a placentação, tanto normal como anormal, além de propiciar um futuro campo para possíveis tratamentos genéticos.

Os fatores angiogênicos estão intimamente relacionados no desenvolvimento placentário. A interação de VEGF com seus receptores tem sido demonstrada tanto na placenta humana (Ahmed et al., 1995; Clark et al., 1998) como na de roedores (Jakeman et al., 1993). Ainda nesse processo de placentação, vários fatores pró-angiogênicos têm sido identificados: fatores de crescimento fibroblástico, crescimento derivado das plaquetas, angiopoietina-1, crescimento de transformação alfa e beta-1,

crescimento epidermal e crescimento de células endoteliais derivado das plaquetas cujo principal representante é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (McMahon, 2000). Dentre os vários fatores pró-angiogênicos, o VEGF se destaca por ser o mais potente e por sua especificidade pelo endotélio vascular, sendo considerado a chave reguladora da angiogênese (Ferrara e Davis-Smyth, 1997; Neufeld et al., 1999).

O VEGF ou VEGF-A é uma molécula multifuncional que regula a morfogênese e o crescimento do sistema vascular, atuando como mitógeno endotelial específico, regulado por diferentes fatores e também pela hipoxia (Breier, 2000). Existem dois receptores principais para VEGF, que são: o VEGFR-1, também conhecido como Flt-1, e o VEGFR-2 ou KDR (também conhecido como Flk-1 em camundongos) (Shibuya et al., 1999). Outro membro da família do VEGF é o PlGF, também um potente fator angiogênico com afinidade pelo receptor VEGFR-1 (Flt-1) (Shibuya, 2001).

No caso de inibição da atividade angiogênica observa-se a desestabilização da parede vascular e a inibição da migração e da proliferação das células endoteliais e de seus precursores (Janota et al., 2003).

Outro fator angiogênico importante para o desenvolvimento placentário é o Fator induzido por hipoxia (HIF) que ocorre nas isoformas HIF-1 α e HIF-1 β . Na presença de oxigênio, HIF-1 α é degradado e em condições de hipoxia, torna-se estável. Este por sua vez, associado ao VEGF, incrementa substancialmente o potencial angiogênico local (McColl et al., 2004).

Outro fenômeno fundamental na invasão trofoblástica é a hipoxia tecidual placentária. A hipoxia é fundamental tanto para um desenvolvimento

placentário normal, promovendo a angiogênese, quanto para o desenvolvimento de um quadro patológico. No primeiro trimestre de gestação, o espaço intervilo placentário apresenta um ambiente com baixa tensão de oxigênio (hipoxia) (Rodesch et al. 1992; Jauniaux et al, 2003), e a proteína HIF- α (mas não seu RNA mensageiro) apresenta aumento de sua expressão no sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto viloso e vasculatura feto-placentária. Essa situação muda no final do primeiro trimestre, quando o fluxo sanguíneo intervilo e a oxigenação placentária aumentam (Rodesch et al. 1992; Jauniaux et al, 2000), diminuindo a expressão de HIF- α (Rajakumar e Conrad, 2000).

Estudos com placentas de gestantes que desenvolvem doenças durante o período gestacional estão, entretanto, limitados a fases específicas associadas às perdas fetais ou ao termo da gestação em pacientes tratadas, o que impede uma abordagem experimental ou mesmo a análise precoce dos processos fisiopatológicos.

Processos alterados na placentação humana podem ser decorrentes de diversas situações cotidianas e clínicas. Um exemplo de evento cotidiano é o estresse. Mulheres que trabalharam exageradamente durante a gestação apresentam maior risco para o desenvolvimento de doenças, provavelmente devido a um distúrbio na placentação (Klonoff-Cohen et al., 1996; Landsbergis e Hatch, 1996; Haelterman et al., 2007). O estresse gerado durante a gestação parece alterar de maneira significativa a fisiologia materna e as funções das células do sistema imune, o que também é um fator de risco para as complicações gestacionais (Coussons-Read et al., 2007). Níveis

aumentados de estresse podem ainda exacerbar a gravidade do problema (Black, 2007), levando a uma incapacidade de adaptação funcional do metabolismo materno frente ao agente estressor (Takiuti et al., 2003).

Um exemplo clínico de doença que ocorre em função de uma placentação/invasão trofoblástica diminuída é a pré-eclâmpsia (Pijnenborg et al., 2008). Esta doença, altamente prevalente (World Health Organization, 2005), caracteriza-se pelo aparecimento de hipertensão arterial após a 20ª semana de gestação e está associada à presença de proteinúria e/ou edema generalizado, ou associado à moléstia trofoblástica gestacional em período anterior (Zugaib e Kahhale, 1985; Friedman et al., 1991) e apresenta repercussões importantes no binômio materno fetal. Apesar de sua etiologia desconhecida, esta doença está associada à invasão trofoblástica inadequada. O estresse cotidiano é um agente com um potencial fator desencadeador de pré-eclâmpsia sugerido inclusive por pesquisas experimentais.

Diversos modelos animais têm sido descritos para tentar compreender a fisiopatologia de diversas doenças que ocorrem na gestação. A utilização de estímulos estressantes durante a gestação em ratas provoca sintomatologia semelhante à observada em gestantes pré-eclâmpicas. Estes estudos constatarem diferenças significativas de pressão, proteinúria (Kanayama et al., 1997; Takiuti et al., 2002), restrição de crescimento fetal, aumento de peso da adrenal, diminuição do relaxamento vascular, diminuição na média de peso fetal (Takiuti et al., 2002), diminuição da invasão trofoblástica, congestão e aumento dos depósitos sub-endoteliais de

fibrinóide nos capilares glomerulares, além de intensa estimulação do sistema nervoso simpático (Kanayama et al., 1997; Khatun et al., 1999).

No mundo moderno, o estresse passou a fazer parte do dia a dia do ser humano, o que traz repercussões físicas e psíquicas, causando doenças. Na gestação, esse fator pode desencadear complicações clínicas e obstétricas, como por exemplo trabalho de parto prematuro (Rondó et al., 2003), restrição de crescimento fetal (Rondó et al., 2003; Triche e Hossain, 2007) e pré-eclâmpsia (Leeners et al., 2007). Essas complicações durante a gestação podem ser resultantes de uma placentação inadequada, o que poderia ser causada por distúrbios nos processos de angiogênese e vasculogênese.

Assim, baseado no conhecimento incompleto dos processos fisiopatogênicos placentários frente ao estresse, para que possam ser determinados tratamentos precoces e eficazes e, na impossibilidade de experimentação com amostras de placentas de gestantes em suas fases iniciais, torna-se imprescindível a investigação desses processos em modelos experimentais que possuam semelhança com humanos.

Neste contexto, pretende-se, no presente estudo, analisar a morfologia e a expressão gênica de fatores angiogênicos de placentas de ratas prenhes submetidas ao estresse crônico e agudo. Assim, será possível conhecer melhor os mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos envolvidos no processo de placentação frente ao estresse.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Processo de implantação e placentação normal em ratas

O rato, assim como outras espécies, inclusive a humana, possui placentação hemocorial. Durante o processo de formação da placentação, uma dinâmica cascata de eventos se desenvolve envolvendo etapas e vias ainda não completamente compreendidas.

Dois eventos na placentação ocorrem em momentos e locais distintos. Inicialmente, forma-se a placenta vitelínica no pólo anembrionário em associação à decídua antimesometrial (Welsh e Endres, 1987), e posteriormente a placenta cório-alantoideana, definitiva, que se desenvolve no pólo embrionário na região mesometrial e é funcionalmente ativa durante o período fetal (Welsh e Endres, 1991).

Durante as fases iniciais da implantação embrionária o trofoblasto mural que recobre o pólo anembrionário do blastocisto adere e penetra na região anti-mesometrial uterina. As células trofoblásticas envolvidas neste processo são células que atingem enormes proporções, poliplóides e que expressam propriedades invasivas e fagocitárias, denominadas de células trofoblásticas gigantes primárias. Simultaneamente, no pólo embrionário do blastocisto voltado para a região mesometrial endometrial, o trofoblástico mantém sua atividade proliferativa e forma uma excrescência que se projeta para a cavidade da cripta uterina denominada de cone ectoplacentário.

Com cerca de 24 horas mais tarde do que no pólo anembrionário, as células periféricas desta estrutura também dão origem a células gigantes denominadas de secundárias, de características morfológicas e funcionais semelhantes às células gigantes primárias. Essas células estão envolvidas com a invasão do endométrio da região uterina mesometrial e juntamente com as demais células diplóides desta estrutura e o ectoderma extra-embrionário e o mesoderma alantoideano formarão a placenta fetal.

A placenta vitelínica forma-se precocemente no pólo abembrionário, na medida em que o mesoderma extra-embrionário alcança e reveste o endoderma parietal do saco vitelino, que, por sua vez, repousa sobre a Membrana de Reichert, que o separa do trofoblasto mural (Gardner, 1983). Este tecido torna-se vascularizado e durante a primeira metade da gestação realiza trocas metabólicas e gasosas com o sangue materno extravasado na superfície das células trofoblásticas gigantes primárias (Jollie, 1968, 1981).

A placenta cório-alantoideana forma-se com a associação da decídua mesometrial e da diferenciação do cone ectoplacentário e ectoderma extra-embrionário após a chegada do mesoderma alantoideano na base desta estrutura.

Após a adesão do mesoderma alantoideano vascularizado à base do ectoderma extra-embrionário, duas ondas de diferenciação se seguem. A primeira na região do cone ectoplacentário propriamente dito formado então por células diplóides proliferativas e células periféricas gigantes unidas entre si por meio de complexos juncionais entre seus longos prolongamentos. Esta disposição confere a esta região a forma de rede de malhas amplas; nos

espaços deixados por estes prolongamentos percola sangue materno extravasado de capilares maternos subepiteliais abertos pelas células gigantes na interface com a decídua. As células diplóides iniciam, então, um processo de diferenciação que culmina com a formação do espongiotrofoblasto, formado por células endócrinas produtoras de hormônios da família da prolactina e por células que acumulam glicogênio. Nas fases iniciais da placentação, estas células são envolvidas por prolongamentos das células gigantes e, com estas, formam a zona juncional da placenta dos roedores.

Na segunda, o ectoderma extra-embriônico associado ao mesoderma extra-embriônico dá origem à região de trocas com o organismo materno, o labirinto. Nesta região, vasos fetais irrigam o mesoderma que, por sua vez, é revestido por 3 camadas de células trofoblásticas, sendo duas delas sinciciais e uma de células individualizadas. Células gigantes também estão presentes na camada de células individualizadas do labirinto que revestem os canais inter-labirínticos, por onde percorre o sangue materno.

O mesoderma alantoideano restringe-se ao labirinto, de modo que a zona juncional não constitui uma região de trocas, mas sim de contato e interação com o organismo materno.

Acentuadamente em ratos, no último terço da prenhez, artérias uterinas maiores abrem-se no leito intra-placentário. Essas artérias apresentam alterações de estrutura, principalmente pela intrusão de células trofoblásticas na parede desses vasos, de forma muito semelhante à invasão

das artérias espiraladas pelo trofoblasto humano extraviloso. A invasão das artérias uterinas pelo trofoblasto de rato prossegue até o 18º dia de gestação. Durante este período a invasão trofoblástica se estende pelo triângulo mesometrial e miométrio (Pijnenborg et al., 1981; Caluwaerts et al., 2005; Vercruysse et al., 2006), o que pode ser comparado à invasão do miométrio em humanos, associada à remodelação vascular uterina.

Variações ocorrem entre os diferentes roedores. A invasão trofoblástica do rato é mais profunda do que a observada em camundongos, que se restringe à decídua (Ain et al., 2003; Pijnenborg et al., 2004). Nesse sentido, o processo de invasão trofoblástica em ratos é um modelo mais adequado para estudos comparativos com o processo de placentação humana, apesar das diferenças em relação aos tipos celulares envolvidos.

2.2 Modelos de estresse em rato

Podemos observar vários modelos, com diferentes tipos de estímulos, que são utilizados para tentar mimetizar situações de estresse em ratos. Os estímulos utilizados podem diferir no tipo de estímulo, na intensidade, na reação fisiológica do animal frente ao estresse. Todos os experimentos visam, entretanto, avaliar e tentar explicar como diversas doenças poderão se comportar frente ao estresse. Os resultados podem ser questionáveis quanto a sua real validade para explicar fisiologicamente estas doenças, mas podemos identificar efeitos fisiológicos onde o indivíduo não consiga ter

o controle da situação, e avaliar os efeitos produzidos por este desequilíbrio. O ambiente externo parece influenciar de diversas formas o indivíduo.

Com a associação de estímulos estressantes, foram observados resultados interessantes em ratas Wistar. Takiuti et al. (2002) associaram estímulo sonoro e superpopulação em pequenas gaiolas do 7° ao 14° dia de prenhez e, posteriormente, no 18° dia, os animais foram submetidos a imobilização por 30 min. O experimento resultou na diminuição da liberação do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) em testes de reatividade vascular, aumento de pressão arterial, aumento da quantidade de proteínas excretadas pela urina, diminuição do peso fetal e aumento do peso da adrenal materna, quando comparados aos grupos controles prenhe e não prenhe.

Este modelo foi utilizado por outro grupo de pesquisa. As ratas que sofreram estresse apresentaram aumento de pressão sanguínea e do nível de proteína excretada na urina, com diferença estatística significativa quando comparadas aos grupos prenhe-controle e não prenhe. Os pesos fetal e placentário apresentaram-se diminuídos e a quantidade de dimetilargina assimétrica no plasma sanguíneo foi aumentada quando comparados ao controle normal (Altun et al., 2008).

Estudo em rato envolvendo estresse e o sistema nervoso simpático foi descrito em 1997 por Kanayama et al., onde ratas prenhes e não prenhes eram mantidas sobre uma placa de gelo a 0°C. Nas ratas que sofreram o estímulo estressante foram observados aumento de pressão e aumento de excreção de proteínas pela urina. Nas ratas prenhes foram detectados diminuição na contagem plaquetária, aumento da epinefrina e norepinefrina,

diminuição da invasão trofoblástica, congestão, depósitos fribrinóide no labirinto, em capilares glomerular, subendotelial. Este método limita-se por não ocorrerem diferenças da pressão sanguínea e quantidade de proteínas excretadas pela urina e alguns achados histológicos entre o grupo prenhe-estressado e não prenhe-estressado.

Em outro estudo realizado com ratas prenhes, que foram mantidas em uma placa de gelo, ou mantidas em placa de gelo e tiveram restrição de comida, ou tiveram somente restrição de comida, observou-se modificações semelhantes às encontradas em gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia, como aumento dos níveis de CRF (fator de liberação de corticotropina), epinefrina (E), norepinefrina (NE), nível de insulina e diminuição do nível plaquetário. Nas ratas que permaneceram sobre a placa de gelo e tiveram restrição alimentar, observou-se depósitos de fibrina no rim, necrose isquêmica, depósito de fibrina no fígado e necrose hemorrágica na adrenal. Quando comparados os estímulos, verificou-se que a associação de mais de um estímulo estressante intensifica a reação produzida no indivíduo, neste caso, ocorre um maior estímulo do sistema nervoso simpático (Khatun et al., 1999).

Um modelo que mimetiza uma placenta abrupta foi descrito utilizando também a placa de gelo, onde as ratas prenhes permaneceram um grupo por 10 min e outro por 15 min a 0°C, 12°C, e o controle permaneceu a 23°C. Tanto em 10 quanto em 15 min, as ratas que ficaram sob a placa a 0°C e 12°C tiveram uma diminuição significativa no fluxo de sangue uterino, sendo menor a 0°C quando comparadas ao controle. A 0°C as ratas apresentaram

um aumento da contração uterina, resultando em uma hemorragia retro-placentária devido a estimulação do nervo simpático (Khatun et al., 2001).

Ao contrário dos estudos acima, foram encontradas alterações no indivíduo prenhe através da hipertermia, mostrando que tanto ambientes muito frios quanto muito quentes podem causar alterações nos organismos. Ratas em vários estágios da gestação foram mantidas a temperaturas entre 43-44°C. Todas foram sacrificadas no 20º dia de prenhez e os resultados significativos foram: nos dias 4, 6 e 8, foi encontrado nos fetos edema, microencefalia e microfitalmia. No 10º dia, foram encontrados defeitos esqueléticos. Aparentemente, após o 14º dia, os embriões não possuem efeitos significativos. As placentas das ratas que sofreram estímulo entre os dias 6 a 10 de gestação foram significativamente maiores, sendo observadas necroses na decídua basal (Arora et al., 1979).

Em experimento realizado com estresse crônico sônico, o resultado demonstrou que animais submetidos ao estímulo de 12h/dia, durante 8 semanas (a 85 dB) ou 16 h/dia durante 4 semanas (95 dB), apresentam significativa elevação da pressão arterial, redução do nível de magnésio plasmático e elevação do cálcio com pequena redução de magnésio no tecido muscular dos vasos sanguíneos. Nos ratos que tiveram restrição alimentar de magnésio (mas não foram submetidos ao estímulo sonoro) foram encontrados níveis de pressão arterial semelhantes aos submetidos ao estímulo quando comparados aos controles. Quando associados os dois estímulos, o aumento de pressão se tornou mais evidente (Altura et al., 1992).

A imobilização parece apresentar um efeito muito estressante em ratos. Ratas prenhes imobilizadas no 20º dia de prenhez, tanto por 20 min quanto por 60 min, apresentaram diminuição de forma significativa no pH do sangue periférico fetal e o nível de corticosterona, demonstrando estado de hipoxia fetal. Com 20 min de imobilização, foi observado aumento no plasma de ACTH. Os níveis de ACTH e corticosterona basal no plasma materno foram significativamente aumentados, tanto com 20 min como com 60 min de imobilização. ACTH diminuiu de forma significativa na pituitária materna com 60 min (Ohkawa et al., 1991).

Em ratos, o efeito da superpopulação não apresentou nenhuma diferença de peso corporal, pressão sanguínea e níveis de nitrito/nitrato no plasma quando comparados aos controles. Foi observada uma tendência do aumento de corticosterona. A síntese de óxido nítrico e os níveis de nitrito/nitrato foram aumentados na aorta. A indução ao relaxamento através da acetilcolina foi significativamente aumentada na artéria femural e mesentérica nos ratos que passaram pelo estímulo, sugerindo que a superpopulação pode aumentar o relaxamento do vaso e a produção vascular de óxido nítrico como um mecanismo adaptativo para a prevenção do aumento da pressão arterial (Bernávotá et al., 2007).

Assim como a superpopulação, o isolamento de animais também causa modificações fisiológicas. Existe uma modificação no comportamento, podendo a superpopulação ser considerada um padrão de estresse crônico, e o isolamento, uma total falta de estímulo social. Os dois ambientes produzem alterações na função da adrenal, medidas pela secreção de

corticosterona e importantes modificações no comportamento destes animais, sendo os efeitos da superpopulação maiores que os do isolamento (Gamallo et al., 1986).

O eixo da atividade pituitária-adrenal parece ser alterado pelo ambiente. A exposição dos animais durante 1 semana ao ambiente estressante da superpopulação, causou diminuição do ganho de peso corporal quando comparados aos controles, o que pode estar associado, em parte, a hipofagia, sendo que o pico deste efeito se dá durante as primeiras 24 h. Também foi observada uma diminuição da atividade exploratória do animal. Os efeitos de 1 dia de estresse pela superpopulação e subsequente a isso, os ratos foram colocados em água gelada por 2 min, mostrando modificações dos níveis de basais glicose plasmática, ACTH e corticosterona. Os ratos controle que foram apenas colocados em água gelada não tiveram as mesmas alterações (Chaoulloff e Zamfir, 1993).

Ratos foram mantidos em estresse com baixa intensidade de superpopulação por 1 ano (5 ratos na gaiola e o controle com 2). Foi observado aumento nuclear, aumento da cromatina e deslocamento de sua posição, da periferia para o núcleo. Mesmo em um estresse moderado, mas crônico, pode-se observar modificações no sistema periférico influenciado pela hipófise. Como observado, este estímulo pode ativar a cromatina anteriormente inativa (Komitowski et al., 1988).

O estado de prenhes parecer causar várias diferenças não encontradas em ratas não prenhe.

2.3 Fatores angiogênicos

2.3.1 Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)

Dentro da família do VEGF estão compreendidas sete glicoproteínas denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PLGF (fator de crescimento placentário) (Ferrara et al., 2003), e VEGF-F, encontrado em veneno de cobra (Suto et al., 2005).

Estas variações ligam-se a determinados receptores e ativam uma cascata de eventos posteriores dependendo da forma variante do gene e do receptor de membrana onde este gene está ligado. VEGF-A tem sido descrito como um regulador para a formação e crescimento de vasos sanguíneos e por estimular sua sobrevivência das células endoteliais (Alon et al., 1995; Benjamin e Keshet, 1997). A ação de VEGF-B não está bem estabelecida e sua ligação com VEGFR-1 parece produzir uma ação mitógena ineficiente (Nash et al., 2006), mas altos níveis de sua expressão podem estar associados com a metástase de linfonodos, em câncer colorretal (Kawakami et al., 2003). VEGF-C e VEGF-D foram encontrados como importantes reguladores da linfogênese (Joukov et al., 1996; Jeltsch et al., 1997). VEGF-E foi encontrado na biblioteca genômica do vírus Orf, e sua variação pode estimular a angiogênese de forma eficiente através de sua ligação com VEGFR-2 (Meyer et al., 1999). VEGF-F foi encontrado em veneno de cobra (Suto et al., 2005), e demonstra uma forte atividade biológica, podendo ser comparada ao VEGF-A (Yamazaki et al., 2005).

VEGF, também descrito como VEGF-A, foi inicialmente descrito por Senger et.al. em 1983, como um fator de permeabilidade tumoral. Anos depois foi isolado, clonado e identificado como um fator mitógeno específico do endotélio por Leung et.al., 1989.

Em ratos, este gene localiza-se no cromossomo 9 (National Center for Biotechnology Information – NCBI, 2008)

Sendo uma molécula multifuncional, a ligação de VEGF com seus receptores estimula a angiogênese (Ferrara e Davis-Smyth, 1997), induz a permeabilidade vascular (Dvorak et al., 1995), manutenção e formação de novos vasos sanguíneos (Alon et al., 1995), estimulação de células endoteliais e migração de monócitos (Clauss et al., 1990; Dvorak et al., 1995) regulado por diferentes fatores como citocinas (como por exemplo, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento epidermal) (Ferrara, 2004). A hipoxia tem sido descrita como um dos maiores reguladores de VEGF tanto *in vitro* como *in vivo* (Minchenko et al., 1994; Ikeda et al., 1995).

VEGF considerado uma proteína pró-angiogênica estimulando a formação e crescimento das células endoteliais dos vasos (Ferrara et al., 2003), é também um potente fator para sobrevivência das células endoteliais por induzir a expressão de proteínas anti-apoptóticas nestas células (Benjamin e Keshet, 1997; Gerber et al., 1998).

O desencadeamento das ações deste gene dentro do organismo acontece através de sua ligação a receptores de membrana específicos. São receptores de tirosina kinase transmembrânico denominados receptor 1 de VEGF (VEGFR-1; Flt) e receptor 2 de VEGF (VEGFR-2 ou KDR) (Otrock et

al., 2007), também conhecido como Flk-1 em camundongos (Terman et al., 1991). VEGF-A possui afinidade também por um receptor não kinase, que se expressa de maneira muito menor chamado neuropilin (NP-1 e NP-2), presente no endotélio vascular. A co-expressão de NP-1 com VEGF-R2 sugere que NP-1 aumenta a ligação de VEGF com VEGF-R2 durante a angiogênese (Soker et al., 1998).

VEGF é um fator angiogênico com importantes funções para o desenvolvimento e manutenção placentária. Ele promove a proliferação de células endoteliais. Pode ser encontrado durante toda a gestação e na placenta a termo. Quando a angiogênese está diminuída, parece estar envolvido com a permeabilidade vascular (Sharkey et al., 1993).

Um estudo realizado com camundongo demonstrou que a inativação de um único alelo deste gene resulta em defeitos vasculares e cardiovasculares, o que foi letal para os embriões (Carmeliet et al., 1996), mostrando a extrema importância para o desenvolvimento embrionário.

2.3.2 Receptor 1 de VEGF (VEGFR-1)

Em 1990 foi isolado um novo tipo de receptor tirosina kinase sendo nomeada Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1, também conhecido como VEGFR-1, expresso exclusivamente em células vasculares endoteliais) (Shibuya et al., 1990). Pouco depois, foi observada a grande afinidade deste receptor pelo VEGF (de Vries et al., 1992). Além da afinidade pelo VEGF, foi observada também sua afinidade pelo fator de crescimento placentário (PlGF) (Selvaraj et al., 2003).

Ele é composto por sete imunoglobulinas extracelulares (Ig) com domínios homólogos, uma região trans-membrânica simples e o domínio intracelular da tirosina kinase (Shibuya et al., 1990). Em ratos, o gene se localiza no cromossomo 12 (NCBI, 2008).

Os receptores do gene VEGF podem ter sua expressão regulada por diversos fatores como hipoxia. A exposição de ratos a hipoxia crônica e aguda levaram a uma super expressão tanto do receptor VEGFR-1 quanto VEGFR-2 na vascularização (Tuder et al., 1995).

Este receptor possui uma ação anti-angiogênica na embriogênese quando ligado ao VEGF. A inativação deste gene em camundongos é letal com 8,5 dias de gestação, causando um crescimento exagerado e a desorganização das células endoteliais, pois este gene possui função regulatória negativa importante para o desenvolvimento vascular (Fong et al., 1995).

Além das células endoteliais vasculares, VEGFR-1 é encontrado também em células dendríticas, osteoclastos, pericitos e no trofoblasto placentário (Dikov et al., 2005; Kaipainen et al., 1993), além dos monócitos e macrófagos regulando a migração e outras funções destas células (Sawano et al, 2001; Barleon et al., 1996).

2.3.3 Receptor 2 de VEGF (VEGFR-2)

Este gene foi primeiramente isolado por Terman et al. em 1991, sendo denominado *Kinase-insert domain containing receptor* (KDR, em humanos). Neste mesmo ano, outro grupo isolou de forma independente VEGFR-2 em

células de camundongo e nomeou como Flk-1 (*Fetal liver kinase-1*)(Matthews et al., 1991).

Este receptor possui, assim como VEGFR-1, uma região extra-celular com sete imunoglobulinas, uma extensão trans-membrânica e uma extensão da tirosina kinase, com aproximadamente 70 aminoácidos inseridos.

O gene se localiza no cromossomo 14 em ratos (NCBI, 2008).

Assim como para o gene VEGF, estados de hipoxia parecem ter influência sobre a regulação deste receptor. Outros estudos mostram que TNF- α (Patterson et al., 1996) e TGF- β (Mandriota et al., 1996) inibem e expressão do gene KDR em cultura de células endoteliais.

Estudos mostram importantes funções realizadas através da ligação de VEGF a este receptor, como proliferação, migração, permeabilidade vascular (Gille et al., 2001), além de induzir primariamente vaso relaxamento e hipotensão (Li, et al., 2002). Flk-1/KDR apresentou uma super regulação após infarto do miocárdio no coração de ratos (Li et al., 1996).

A ativação de VEGFR-2 tem demonstrado ser necessária para um efeito anti-apoptótico de VEGF em células endoteliais da veia umbilical humana (Gerber et al., 1998).

Pode-se observar grande expressão deste gene em estágios precoces da embriogênese no endotélio vascular, mas sua expressão declina gradativamente em estágios tardios do desenvolvimento vascular tendo uma super expressão apenas em estados patológicos como tumores (Matsumoto e Claesson-Welsh, 2001). Em experimento realizado em

camundongos com ausência do gene Flk-1, resulta em morte fetal entre 8,5 e 9,5 dias de prenhez (Shalaby et al., 1995).

Sua expressão tem sido observada também em células não endoteliais, como células neuronais, osteoblastos, células do ducto pancreático, células progenitoras da retina e megacariócitos (Matsumoto e Claesson-Welsh, 2001).

2.3.4 Fator de crescimento placentário (PlGF)

PlGF foi descoberto no originalmente no tecido placentário, fato que deu nome ao gene. É um membro da família dos VEGFs e possui cerca de 53% de homologia VEGF (Maglione et al., 1991). Possui alta afinidade com o receptor 1 de VEGF mas não com o receptor 2 (Park et al., 1994). Além do tecido placentário, sua expressão pode ser encontrada também no coração, pulmão, cérebro e músculo esquelético (Maglione et al., 1991; Pérsico et al., 1999). Em ratos, encontra-se no cromossomo 6 (NCBI, 2008).

Como homodímero, PlGF possui uma fraca propriedade angiogênica *in vivo*, produzindo, assim, uma fraca resposta mitogênica das células endoteliais (Park et al., 1994; Migdal et al., 1998), mas possui capacidade de formar heterodímero com VEGF (DiSalvo et al., 1995). Existem algumas evidências em que estes heterodímeros induzem a angiogênese (DiSalvo et al., 1995; Eriksson et al., 2002).

PlGF possui uma importante ação vasodilatadora em vários tipos de vasos, através de sua ligação com o receptor VEGFR-1, tanto em humanos como em ratos. Nas artérias uterinas, mas não nas veias das ratas, a

dilatação é mediada principalmente pela liberação de Óxido Nítrico (NO) (Osol et al., 2008).

Em experimento realizado com camundongos, onde foi deletado o gene PIGF, não foi observado nenhum defeito significativo no desenvolvimento vascular, mas sua super-expressão na pele resultou no aumento da formação de vasos e no aumento da permeabilidade (Odorisio et al., 2002), produzindo um efeito pró-angiogênico deste fator.

2.3.5 Fator induzido por hipoxia 1 α (HIF-1 α)

HIF é um fator de transcrição que funciona na forma de heterodímero e pertence à família dos fatores de transcrição *basic-helix-loop-helix-PAS* (bHLH-PAS). É composto pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β (conhecida também como translocador nuclear receptor de aril hidrocarbono, ARNT) (Wang et al., 1995). HIF-1 α encontra-se no cromossoma 6, em ratos (NCBI, 2008).

Este gene possui um papel fundamental na regulação de processos fisiológicos e fisiopatológicos. Como adaptação fisiológica atua no metabolismo energético, homeostase de ferro, viabilidade e proliferação celular e angiogênese. Ele participa também na regulação de processos patológicos, como câncer, isquemia do miocárdio, pré-eclâmpsia, restrição do crescimento fetal intrauterino, hipertensão pulmonar e isquemia cerebral (Semenza, 2000).

A proteína apresenta uma relação direta em relação a tensão de oxigênio dos tecidos. Estados de hipoxia aumentam a atividade de HIF pelo aumento da estabilização da proteína (Salceda e Caro, 1997; Huang et al., 1998).

Quando o tecido encontra-se em estado de normóxia, resíduos de prolina da proteína HIF-1 são hidroxilizados permitindo desta forma sua ligação com a proteína von Hippel Lindal (pVHL) (Jaakkola et al., 2001; Masson et al., 2001; Yu et al., 2001). A interação da ligação pVHL-HIF com proteínas do complexo ubiquitina ligase induz à degradação do proteassoma. Por esta interação, HIF apresenta normalmente uma meia vida de 5 a 10 min, em condições de normóxia (Wang et al., 1995).

Estudo realizado com placentas de pacientes com pré-eclâmpsia mostra a super-expressão deste gene, resultado que foi atribuído à provável hipoxia placentária (Rajakumar et al., 2001). *In vitro*, placentas como essas também parecem possuir uma falha na degradação desta proteína (Rajakumar et al., 2003).

Em experimento realizado com camundongos, que não expressavam HIF-1 α , o resultado foi a morte embrionária, fato atribuído a falta de vascularização (Iyer et al., 1998), indicando a importância deste gene para a angiogênese. Têm sido identificadas mais de 60 proteínas onde HIF pode estar induzindo sua transcrição, como por exemplo VEGF, promovendo a angiogênese (Semenza, 2002).

2.4 Angiogênese na placenta de roedores

Diversos mecanismos estão envolvidos no processo de placentação e crescimento fetal. Esses processos são extremamente coordenados com a

indução e inibição de fatores de vital importância, entre os quais se destacam hormônios e fatores angiogênicos (Jojovic et al., 1998; Srivastava et al., 1998; Dahl et al., 2005).

VEGF é um dos fatores angiogênicos de maior destaque na literatura. A partir de sua ligação com específicos receptores, desencadeia-se uma cascata de eventos para a formação de vasos sanguíneos (Breier et al., 1997; Dumont et al., 1995) ou para aumentar a permeabilidade vascular (Chakraborty et al., 1995). Este fator também contribui para o controle da angiogênese e vasculogênese durante o desenvolvimento embrionário. No início da gestação em ratos, o VEGF é diferencialmente expresso no trofoblasto e no embrioblasto. O VEGF produzido pelo trofoblasto acredita-se estar envolvido com o crescimento e proliferação das células endoteliais decíduais e da placenta fetal (Jakeman et al., 1993).

A inativação do gene que codifica o VEGF em camundongos resulta em desenvolvimento vascular anormal e é letal (Breier et al., 1997). Utilizando técnicas de isquemia e reperfusão na placenta, observou-se restrição de crescimento fetal, mas não se encontrou alterações na expressão deste gene, apesar de ser amplamente conhecida a indução de expressão de VEGF e seus receptores pela hipoxia (Yamazaki et al., 2006).

Poucos dias após a implantação, pode-se identificar a expressão de VEGF nas células gigantes do trofoblasto, sugerindo que este fator pode estar diretamente ligado ao crescimento vascular na decídua, placenta e membranas vasculares (Breier et al., 1992; Jakeman et al., 1993).

Nas fases finais da prenhez do rato, observa-se na placenta um aumento na produção de fatores angiogênicos, tais como o PlGF, que contribui para o crescimento placentário, para o desenvolvimento fetal e para a manutenção da gestação. Este gene foi também descrito como um importante vasodilatador durante a gestação tanto em ratos quanto em humanos, agindo através do receptor 1 de VEGF (Osol et al., 2008).

Experimentos também têm mostrado que a tensão de oxigênio mediada pelo HIF (fator induzido por hipoxia) é um regulador essencial do desenvolvimento vascular placentário (Dahl et al., 2005). Em ratos, culturas de células trofoblásticas submetidas à hipoxia e expressando HIF sugerem também uma participação deste gene na regulação da diferenciação de células gigantes do trofoblasto (Takeda et al., 2007).

Até o momento não foram estudados os fatores angiogênicos nas placentas de ratas submetidas ao estresse.

3 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

1. Analisar parâmetros gestacionais dos animais do grupo prenhe-controle e grupo prenhe-estressado (pesos materno, fetal e placentário);
2. Verificar diferenças histológicas existentes nas placentas das ratas do grupo prenhe-estressado e grupo prenhe-controle no 20º dia de prenhez;
3. Avaliar a expressão gênica de Hlf-1 α e dos fatores PIGF e VEGF-A e seus receptores: VEGFR-1 e VEGFR-2 na placenta aos 20 dias de prenhez das ratas submetidas ao estresse crônico e agudo e de ratas prenhes controle.

4 MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental tipo caso-controle realizado no Laboratório de Fisiologia Obstétrica (LIM57), da Faculdade de Medicina e no Laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, realizado de setembro de 2007 a julho de 2008.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição em 19/07/2007 (Anexo A e B).

4.1 Casuística

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas 12 ratas da linhagem Wistar, normotensas, não submetidas a qualquer experimento anterior e nem a prévio acasalamento, com idade entre 9 e 11 semanas, e 3 machos de mesma linhagem para acasalamento. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP e transferidos para o Biotério do Laboratório de Fisiologia Obstétrica (LIM 57), onde permaneceram durante uma semana para aclimação. Durante todo o processo os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro (12 h claro/12 h escuro) com livre acesso a água e comida.

4.1.1 Acasalamento

O acasalamento dos animais foi realizado colocando um rato macho à noite em uma gaiola contendo de quatro a seis fêmeas. A presença de prenhez foi identificada por meio de esfregaço vaginal, realizado no dia seguinte para a detecção de espermatozóides visualizados em microscópio de luz convencional. Sendo identificados espermatozóides, este dia foi considerado o primeiro dia de prenhez.

4.1.2 Formação dos grupos de animais

Após o acasalamento e a confirmação da prenhez, as ratas foram divididas em dois grupos distintos: Grupo prenhe-estresse e grupo prenhe-controle. Os experimentos foram realizados sempre de forma pareada para evitar alterações por outros estímulos, como temperatura e manipulação.

4.1.2.1 Grupo 1

As ratas do grupo prenhe-estressado foram submetidas a dois tipos de estímulo estressante subsequentes: um estímulo crônico e um estímulo agudo.

Como técnica de indução do estresse crônico, as fêmeas foram submetidas aos estímulos sônico e de competição (provocado pela superpopulação), entre o 7º e o 14º dia da prenhez. O estresse agudo foi realizado por meio da imobilização do animal no 18º dia de prenhez, conforme descrição detalhada no item 4.2.1.

Como parâmetro gestacional materno, as ratas foram pesadas no 1º dia de prenhez, 7º dia (quando as ratas foram colocadas na caixa para o estímulo crônico), 14º dia (momento em que termina o estímulo crônico) e no 20º dia (dia em que foram sacrificadas) (Figura 1).

Figura 1 - Cronograma de estímulo realizado nas ratas prenhes do grupo prenhe-estressado demonstrando o 1º dia de prenhez, o período em que as ratas ficam dentro da caixa de estímulo estressante crônico (7º ao 14º), dia do estresse agudo (18º), sacrifício (20º) e os dias em que as ratas foram pesadas (1º, 7º, 14º e 20º).

4.1.2.2 Grupo 2

Estas ratas (prenhe-controle), após a confirmação da prenhez permaneceram no biotério e não sofreram qualquer tipo de estímulo. Foram feitas medidas de peso materno conforme descrito acima (Figura 2).

Figura 2 - Cronograma de procedimentos das ratas do grupo prenhe-controle demonstrando o 1º dia de prenhez, e os dias em que as ratas foram pesadas (1º, 7º, 14º, 20º).

4.2 Modelo experimental de estresse

4.2.1 Estresse crônico e agudo

Os estímulos utilizados para a geração de estresse crônico e agudo, capazes de gerar hipertensão gestacional, seguiram o protocolo anteriormente utilizado e descrito por Takiuti et al. (2002).

Para o estímulo crônico, foram colocadas de 6 a 8 ratas em uma caixa medindo 18 cm de largura por 24 cm de comprimento e 20 cm de altura. Essas caixas foram colocadas dentro de uma caixa de madeira com capacidade para quatro gaiolas. Quando não haviam ratas prenhes suficientes para completar a super-população da caixa, eram utilizadas ratas não prenhes. Cada caixa era equipada com alarme timpânico, sistema de iluminação com ciclo claro/escuro e sistema de ventilação/exaustão. Externamente a esta caixa havia outra caixa de papelão com lã de vidro que recobria totalmente a caixa de madeira, garantindo um isolamento acústico satisfatório para os outros animais. O estímulo sônico foi feito por meio de um alarme timpânico (Sincron, modelo TT6, Brazil), capaz de gerar ruído de 100 dB na sua proximidade. Esse alarme estava conectado a um dispositivo tipo “*timer*”, que mantinha o estímulo sonoro durante 30 min e este era interrompido por um intervalo de 90 min. O estímulo crônico estendeu-se do 7° ao 14° dia de prenhez no grupo prenhe-estressado.

O estresse agudo foi realizado por meio da imobilização do animal no 18° dia de prenhez. Para isto, os animais foram imobilizados em pequenas gaiolas que mediam 15 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, durante 30 min, em ambiente a 37°C.

4.2.2 Sacrifício e obtenção das placentas

Todos os 12 animais foram anestesiados com 0,15 mL de Ketamina associado a 0,05 mL de Xilasina para cada 100 g de peso do animal.

Depois de anestesiados, os animais foram laparatomizados para a remoção das placentas e fetos. Todas as placentas e os fetos das ratas do grupo prenhe-estressado ($n=83$) e das ratas do grupo prenhe-controle ($n=84$) foram pesados. A seguir, fragmentos das 3 menores placentas de cada rata foram lavadas em solução salina a 0,9 %, colocadas em solução e imediatamente armazenadas em freezer a -70°C para futuras análises moleculares. De cada rata foi obtido um “pool” das 3 menores placentas. Fragmentos destas placentas foram também recolhidos em soluções fixadoras e mantidos em geladeira a 4°C , para futuras análises histológicas.

Imediatamente após a coleta das placentas, as fêmeas e os fetos foram sacrificados em câmara de CO_2 .

4.3 Reagentes, abreviaturas e procedência

Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda (São Paulo, SP, Brasil): Ketamina; Schering-Plough Coopers Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil): Xilasina; Invitrogen – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA): TRizol®, agarose, brometo de etídio, *random primer*, deoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dTTP, dGTP), dietil pirocarbonato (DEPC),

MOPS [ácido 3-(N-morfolino propano sulfônico)], DNA *Ladder* 100 pares de base (pb), *Blue Juice*, deoxirribonuclease I (DNase I), Taq DNA polimerase, *SuperScript III Platinum® SYBR® Green One-Step qPCR*, glicogênio; Labsynth produtos para laboratório Ltda (Diadema, SP, São Paulo): formaldeído, paraformaldeído, álcool etílico, álcool isopropílico, xilol, cloreto de sódio (NaCl), clorofórmio; Mallinckrodt Baker Inc. (Paris, Kentucky, USA): Eosina, Hematoxilina. Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha): Histosec®, acetato de sódio (NaOAc), azul de bromofenol, entellan; Promega Corporation (Madison, WI, USA): *ImProm-II™ Reverse Transcription*; Sigma-aldrich Corporation (St. Louis, USA): Poli-L-lisina, reagente de Bradford; Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK): *GFX gel band purificator*; Applied Biosystems (Califórnia, EUA): *bigdye v3.1*.

4.4 Análise das amostras placentárias

4.4.1 Armazenamento das placentas para análise histológica

Os fragmentos das placentas foram lavados em solução salina (NaCl a 0,9% em água destilada) até que todo vestígio de sangue fosse retirado. Logo após, estas amostras foram colocadas em solução de paraformaldeído, a 4% em 0,1 M tampão fosfato-salina pH 7,2 para fixação dos tecidos.

4.4.2 Armazenamento das placentas para extração de RNA

Imediatamente após a retirada das placentas, estas foram fragmentadas e lavadas em solução salina a 0,9%. Fragmentos de placentas de 3 placentas de cada animal foram armazenados em microtubos (livre de DNase e RNase), de 1,7 mL contendo 500 µL de Trizol, formando um “pool” de cada animal e estas foram congeladas em freezer a -70°C, até o momento das análises subsequentes.

4.5 Análise histológica

O processo de remoção e preparação das amostras de placentas foi cuidadosamente realizado, de modo a não danificar as estruturas.

4.5.1 Preparo do tecido

Após a fixação do material, as amostras foram rapidamente lavadas em água corrente e inseridas no equipamento para desidratação e embebição em parafina (Microm International GmbH, modelo HM 110, Walldorf, Germany). Brevemente, as amostras passaram pelas seguintes etapas: i) desidratação em etanóis de concentração crescente (70% a 100%); ii) diafanização com xilol, através da qual a água tecidual é substituída por xilol; iii) embebição em parafina (Histosec®) a 56° C. As peças foram, então, cuidadosa e manualmente colocadas no fundo de uma pequena forma de metal e cobertas por parafina para a formação dos blocos.

Secções histológicas de 5 μm de espessura foram obtidas em um micrótomo (Microm International GmbH, modelo HM 200, Walldorf, Germany) e recolhidas em lâminas histológicas cobertas com poli – L – lisina.

4.5.2 Coloração pela hematoxina e eosina (HE)

Após secos, os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em banhos seqüenciais de etanol (100 % a 70 %) e água corrente.

Os preparados foram então corados pela hematoxilina de Mayer (1 min), lavados em água corrente (10 min), e, em seguida, corados novamente pela eosina (2 min). Após lavagens em etanol 70 %, as amostras foram desidratadas em série de concentrações crescentes de etanol (95% e 100%), diafanizadas em xilol e cobertas com resina Entellan e lamínulas de vidro. A análise histológica foi feita observando os cortes em microscópio ótico (NIKON, modelo Optiphot-2, Japan).

4.6 Desenho dos iniciadores (*primers*)

Para a construção de seqüências iniciadoras, alguns parâmetros foram levados em consideração como tamanho do *primer*, tamanho da seqüência final (em média de 200 bases), ausência de regiões passíveis de auto-anelamento (*loops*), regiões passíveis de homodimerização (anelamento dos *primers sense* e *anti-sense*) e temperatura de anelamento dos *primers*.

As seqüências dos genes de interesses livres de *introns* foram selecionadas a partir dos bancos de dados gênicos disponíveis. Foi calculado, então, o tamanho das seqüências de *introns* para que os *primers sense* estivessem em um *exon* e os *anti-sense* em outro *exon*, separados por um *intron*, geralmente com mais de 1.000 bases, de modo a garantir que só as seqüências de RNA fossem amplificadas. Os desenhos dos *primers* e suas condições ideais de uso foram obtidos a partir do programa *Primer3* (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) (Rozen e Skaletsky, 2000).

Para determinar se os *primers* selecionados continham seqüências similares (homólogas) de outros genes, utilizou-se a análise de alinhamento a partir dos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) e GENOME (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Os *primers* foram também submetidos ao programa OLIGOTECH (Oligos Etc. Inc., Wilsonville, OR, USA) para uma re-checagem da possibilidade de formação de *loop* e homodimerização. Essas seqüências encontram-se compiladas no Anexo C.

Após a síntese das seqüências iniciadoras *sense* e *anti-sense*, estas foram testadas para verificar se o produto final amplificado era compatível com o produto inicialmente almejado. Para tal, as técnicas abaixo listadas correlacionaram o tamanho esperado dos fragmentos com os dos produtos amplificados.

4.7 Extração do RNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol, conforme protocolo adaptado de Hoshida et al. (2007).

As amostras foram homogeneizadas (Dremel multipro, modelo 395, Mexico) em Trizol. A seguir receberam 200 μ L de clorofórmio e foram agitadas em vortex (Scientific Industries, Inc., Vortex-Genie® , modelo K-550-G, Bohemia, New York, USA) até que ficassem com aspecto leitoso. As amostras foram, então, deixadas em repouso no gelo por 15 min, para a quebra da membrana nuclear e separação do DNA genômico das proteínas e do RNA.

Após este período, foram centrifugadas (Eppendorf, modelo 5804R, Hamburg, Germany) a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C para melhor definição das fases DNA, proteína e RNA. A fase aquosa transparente (RNA) das amostras foi transferida para novos microtubos estéreis e livres de nucleases, contendo 500 μ L de isopropanol. Após permanecerem em freezer, a -70°C, por 1h30 para a precipitação do RNA, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 15 min, a 4° C, tendo o sobrenadante sido desprezado e o *pellet* acrescido de 500 μ L de etanol 75 %. Após nova centrifugação, a 8.000 rpm, por 10 min, a 4° C, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* seco a temperatura ambiente. Finalmente, este foi adicionado a 50 μ L de água livre de RNases e incubado a 60° C (Techne Dri-Block® heater, modelo DB-2A, Cambridge, UK), por 10 min.

4.7.1 Determinação da integridade e quantidade de RNA total

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Biophotometer Eppendorf, Germany). Em seguida, aplicou-se a mistura composta de 2 µg de RNA total, 2 µL de tampão de amostra e água livre de Rnase q.s.p. 10 µL nas canaletas do gel contendo 0,4 g de agarose, 4 mL de MOPS, 1,6 mL de formaldeído a 37%, 34,4 mL de água livre de RNase e 1 µL de brometo de etídio para verificar a qualidade e integridade do RNA extraído por meio de eletroforese (Figura 3A).

4.7.2 Síntese de cDNA

Para que as seqüências fossem amplificadas, foi necessário construir seqüências de cDNA a partir do RNA total, utilizando-se a enzima transcriptase reversa, que sintetiza um DNA complementar (cDNA) a partir de uma fita molde de RNA.

A amostra de RNA foi preparada com 1 µg de RNA total, 0,5 µL de *random primer* e água livre de RNase q.s.p. 5 µL. Esta mistura foi colocada no termociclador (Eppendorf, modelo *Mastercycler GradientS*, Hamburg, Germany), a 70°C, por 5 min.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o Kit ImProm II – *Reverse Transcriptase System*, adicionando-se às amostras a mistura: 4 µL de tampão *buffer* (5x), 2,4 µL de cloreto de magnésio, 1 µL de dNTP mix (10mM), 1 µL de enzima e 6,6 µL de água livre de RNase.

As amostras foram colocadas novamente no termociclador, sendo submetidas ao seguinte protocolo seqüencial de tempos e temperaturas: 4° C, por 10 min; 25° C, por 5 min, 42° C por 1 h e 70° C por 15 min.

A conversão de RNA em cDNA foi confirmada em corrida em cuba eletroforética (Amersham Bioscience, Hoefer, modelo HE33, Buckinghamshire, UK) no gel de agarose a 1,5 % (corado com brometo de etídio), a 87 V, por 30 min. Para isto, 2 µL das amostras associados a 5 µL de *blue juice* (1X) e 3 µL de água ultra-pura, foram aplicados ao gel (Figura 3 B).

4.7.3 Técnica de PCR (polymerase chain reaction)

Após a confirmação da presença de cDNA, a amplificação de cada produto desejado foi realizada utilizando-se a técnica de reação da polimerização em cadeia (PCR).

Para cada *primer* de interesse foi utilizado: 2,5 µL de buffer (10x), 0,5 µL de dNTPs, 0,75 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,5 µL de *primer sense* (10 mM), 0,5 µL de *primer anti-sense* (10 mM), 1 µL de cDNA. Esta mistura foi incubada a 94° C, por 5 min, no termociclador e, em seguida, recebeu 0,2 µL de Taq polimerase 5 U/µL, sendo novamente incubada por:

94°C – 3 min

94°C – 1 min

59°C – 1 min

72°C – 1 min

72°C – 10 min

4°C ∞

} 30 x

Para verificação da amplificação dos cDNAs, 8 μ L de cada amostra foram misturadas com 2 μ L de *blue juice* e aplicados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, em cuba de eletroforese com uma corrente de 87 V, por 30 min. No mesmo gel também foi aplicado um peso molecular de referência para estimativa do tamanho dos genes amplificados (Figura 3 C).

4.8 Seqüenciamento

Quando o gene em estudo possui várias formas alternativas e estas formas possuem tamanhos diferentes, como é o caso do gene VEGF-A, faz-se necessário confirmar a especificidade dos *primers*. Para isso, contamos com a técnica de seqüenciamento que permite determinar a seqüência de nucleotídeos em um fragmento de cDNA.

4.8.1 Purificação de cDNA

Após PCR e eletroforese em gel de agarose 2%, as duas bandas correspondentes às variantes do VEGF-A foram recortadas do gel com ajuda de uma lâmina de bisturi e adicionadas, individualmente em microtubos de 1,7 μ L previamente identificados e pesados. Em seguida, os tubos com os géis foram novamente pesados e os valores dos pesos iniciais foram subtraídos.

Os fragmentos amplificados foram purificados com a utilização do kit *GFX gel band purificator*. Brevemente, para cada 10 mg de gel foi adicionado 10 μ L do tampão de captura. A mistura foi então fortemente agitada e incubada a 65°C até a total dissolução da agarose (5-10 min), após o que esta foi centrifugada. Todo conteúdo de cada tubo foi transferido para colunas do kit GFX e incubado a temperatura ambiente, por 1 min. Em seguida, as colunas foram centrifugadas 12.000 rpm por aproximadamente 35 s. Na sequência, o filtrado foi descartado e as colunas acondicionadas em tubos, adicionado 500 μ L de tampão de lavagem/tubo; o filtrado era descartado após centrifugação (35 s). Este procedimento foi repetido até a completa retirada do tampão. As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL devidamente identificados, onde receberam 40 μ L de água ultrapura autoclavada e foram incubadas à temperatura ambiente por 1 min. O cDNA eluído foi centrifugado a 12.000 rpm, por 1 min, e recolhido do precipitado. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro.

4.8.2 Re-amplificação de DNA purificado

Devido à pequena quantidade de material obtido após a purificação, foi realizada uma re-amplificação a partir de 2 μ L de cDNA purificado, seguindo os mesmos padrões de concentração e ciclagem descritos anteriormente, a fim de se adquirir a quantidade desejada de cDNA para a realização do protocolo de seqüenciamento. Após a re-amplificação as amostras foram quantificadas, e 8 μ L de cada amostra foram misturadas com 2 μ L de *blue juice* e aplicados em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio, em cuba de eletroforese com uma corrente de 87 V, por 30 min, para certificar a amplificação correta do gene desejado (Figura 3D).

Figura 3 - Análise do material obtido por eletroforese em gel de agarose. (A) Verificação da integridade do RNA extraído das amostras; observar a presença das frações ribossomais 28S e 18S nas amostras abaixo representadas. (B) Confirmação da síntese de cDNA a partir do RNA extraído. (C) Análise dos produtos amplificados por PCR: validação dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes de interesse comparando-se o tamanho da banda eletroforética do material amplificado ao marcador molecular de 100 pares de bases (M). R1=VEGFR-1; R2=VEGFR-2; B-ACT=β-actina. Notar que com o *primer* de VEGF duas bandas foram geradas (setas). (D) Após a separação das bandas, purificação e re-amplificação as bandas podem ser observadas em duas reações, separadas para serem seqüenciadas

4.8.3 Seqüenciamento de DNA

Para a realização do protocolo de seqüenciamento foi utilizado 200 ng de DNA, 3 μL de *primer* (3,2 pmoles/uL), 3 μL (5X) tampão de seqüenciamento, 2 μL de *bigdye* v3.1 e água ultrapura q.s.p. 15 μL, agitados

em um pulso de 1000 rpm. As amostras foram colocadas em termociclador utilizando-se os seguintes parâmetros:

96°C 2 min
96°C 45 s } 35 x
50°C 30 s }
59°C 4 min
4°C ∞

4.8.4 Precipitação da reação de seqüenciamento utilizando glicogênio

Aos 15 µL de cada reação de seqüenciamento, adicionou-se o coquetel de precipitação contendo: 23 µL de etanol 100 % gelado, 1 µL de 3 M NaOAc pH 5,2 e 1 µL de glicogênio a 1 mg/mL. As amostras contendo o coquetel foram agitadas em vortex e mantidas em gelo por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 30 min, à temperatura ambiente. A seguir, inverteram-se os tubos descartando-se o excesso e submetendo-os a dois pulsos de 1.000 rpm. Foram, então, adicionados 50 µL de etanol 70 % gelado por reação e repetidas as etapas de centrifugação e drenagem dos tubos. Estes foram secos por 1 h em lugar protegido da luz.

Essas placas foram colocadas no seqüenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (HITACHI, London, UK). As sequências geradas foram checadas no GenBank (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) para identificação das seqüências gênicas presentes nas amostras (Tabela 1).

Tabela 1 – Variações que podem ser amplificadas com o *primer* de VEGF-A. Notar que apenas formas variantes de VEGF-A foram amplificadas

Número de acesso do gene	Descrição
NM_001110335.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor A (Vegfa), transcript variant 4, mRNA
NM_031836.2	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor A (Vegfa), transcript variant 1, mRNA
AY033508.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) clone 10 mRNA, complete cds, alternatively spliced
AF261751.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor 188 protein mRNA, partial cds
AF215725.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor-A 188 mRNA, alternatively spliced, complete cds
AF062644.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor mRNA, partial cds
L20913.1	Rat - Vascular Endothelial Growth Factor form 3 mRNA, partial cds
AY702972.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) mRNA, complete cds, alternatively spliced
NM_001110336.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor A (Vegfa), transcript variant 5, mRNA
NM_001110333.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor A (Vegfa), transcript variant 2, mRNA
AY033506.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) clone 5 mRNA, complete cds, alternatively spliced
AY033504.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) clone 2 mRNA, complete cds, alternatively spliced
AF260425.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) 164 protein mRNA, partial cds
M32167.1	Rat - glioma-derived Vascular Endothelial Growth Factor mRNA, complete cds
AY033507.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) clone 6 mRNA, complete cds, alternatively spliced
AF261751.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) 188 protein mRNA, partial cds
NM_001110334.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor A (Vegfa), transcript variant 3, mRNA
AY033503.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) clone 1 mRNA, complete cds, alternatively spliced
AF222779.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor-A 144 mRNA, alternatively spliced, complete cds
AF215726.1	<i>Rattus norvegicus</i> - Vascular Endothelial Growth Factor-A 120 mRNA, alternatively spliced, complete cds

Estando todos os genes confirmados e validados, realizou-se a reação da PCR em tempo real.

4.9 Análise da expressão gênica

4.9.1 Quantificação da expressão gênica de PIGF, VEGFA, VEGFR-1, VEGFR-2 e HIF-1 α

A PCR em tempo real permite a quantificação de ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold* (Ct). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseada na emissão de um sinal fluorescente. Um dos fluoróforos mais utilizados é o *SYBR Green*, que se liga com alta afinidade entre a fita dupla de DNA e que, com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. A ligação do *SYBR Green* é específica e estequiométrica, de modo que a emissão da fluorescência é um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de DNA ou, no caso, do produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado.

4.9.2 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

Após a criação e validação dos *primers* específicos, que flanqueiam a região correta de amplificação dos cDNAs, foi realizada a PCR quantitativa.

Para evitar a contaminação com qualquer DNA genômico que pudesse existir na amostra, realizou-se a digestão de DNA do material

através do kit DNase I. Em um tubo de 500 µL foram incubados durante 15 min: 1 µg da amostra, 1 µL da solução tampão (10x), 1 µL de DNase I e água livre de RNase q.s.p. 10 µL. A reação foi incubada por 15 min em temperatura ambiente e, em seguida, a DNase foi inativada, adicionando-se 1 µL de 25 mM EDTA, a 65° C, por 10 min.

Antes de serem utilizadas as amostras, foram realizadas as curvas de eficiência para todos os genes, conforme descrito abaixo. Nestas reações utilizaram-se diferentes concentrações de RNA total para cada gene, a saber: 25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng e 400 ng de RNA total e, após a PCR em tempo real, foram traçadas as curvas de eficiências para determinar a melhor concentração a ser utilizada nas amostras e para traçar o perfil das curvas a ser utilizado nos cálculos.

Tendo o RNA extraído e validado, foi utilizado o *Kit Super Script III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR* para a quantificação da PCR em tempo real, a partir do RNA total.

Para a PCR quantitativa foi preparado um mix contendo para cada reação 1 µL de *Super Script III RT/Platinum Taq Mix*, 25 µL de *SYBR Green Reation Mix (2X)*, 1 µL de *primer sense (10 mM)*, 1 µL de *primer anti-sense (10 mM)*, 50 ng da amostra e água livre de RNase q.s.p. 50 µL.

Estas amostras foram colocadas no termociclador Rotor-Gene (Corbett Research, Austria) para a amplificação e quantificação da PCR, utilizando-se um programa pré-estabelecido com os seguintes ciclos:

50° C – 3 min
95° C – 5 min
95° C – 15 seg } 40 x
59° C – 30 seg }
40° C – 1 min

Para confirmar que apenas o gene de interesse estava sendo amplificado, ao final de cada reação a temperatura do termociclador foi aumentada grau a grau até que ocorresse o desanelamento dos produtos da PCR, formando a curva de “*melting*”. Caso houvesse duas amplificações diferentes com tamanhos diferentes, a temperatura de desanelamento não seria igual para os dois produtos, formando-se dois picos na curva de emissão de unidades de fluorescência em função do tempo e da temperatura (Figura 4).

Figura 4 - Curva de *melting* mostrando que durante a reação de *real time* PCR, apenas os genes referentes aos *primers* escolhidos foram amplificados. As figuras mostram a amplificação de β -actina (A), VEGFA (B), VEGFR-1 (C), VEGFR-2 (D), PLGF (E), HIF-1 α (F)

Foi utilizado o gene constitutivo β -actina como gene de referência placentário, e as reações foram normalizadas com uma amostra controle presente em todas as reações. Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Os cálculos foram realizados de acordo com as fórmulas descritas por Pfaffl (2001):

$$\text{Razão: } \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta C_{\text{t}}_{\text{alvo}}(\text{controle-amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{t}}_{\text{ref}}(\text{controle-amostra})}}$$

Onde:

E – eficiência da curva

C_t (*Threshold Cycle*) – ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção do equipamento, servindo como base para comparação entre amostras.

Referência - β -actina

Controle – amostra pré-selecionada que é colocada em todos os experimentos, com todos os genes.

Alvo – expressão do gene de interesse.

4.10 Análise estatística

As amostras utilizadas na análise foram compostas por 6 ratas prenhe-estressadas e 6 ratas prenhes-controles.

Para os dados relacionados aos parâmetros gestacionais como pesos maternos, placentários e fetais, utilizou-se o teste paramétrico *t student* devido a distribuição normal das amostras, que avalia a diferença entre médias (SPSS 14, *Statistical Software*, Chicago, IL, EUA). Além disso, para se avaliar a influência do estresse sobre o peso materno, foi calculada a diferença entre o inicial (no primeiro dia de prenhez) e o final (no vigésimo dia de prenhez), obtido imediatamente antes dos sacrifícios. Para este

parâmetro utilizou-se o teste estatístico não-paramétrico U de Mann Whitney (SPSS 14, *Statistical Software*, Chicago, IL, EUA).

Para análise da expressão dos RNAm, por não possuir uma distribuição normal, utilizou-se o teste estatístico não-paramétrico U de Mann Whitney (SPSS 14, *Statistical Software*, Chicago, IL, EUA).

Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos parâmetros gestacionais

5.1.1 Avaliação do peso materno

Foram estudadas 6 ratas de cada grupo. Os pesos maternos variaram entre os grupos e o grupo prenhe-estressado, apresentando valores estatisticamente menores após o estímulo estressante (Tabela 2). Quando comparados os ganhos de peso entre as fêmeas do grupo prenhe-controle e prenhe-estressado, observaram-se diferenças significativas entre ambos (* $p=0,025$) (Tabela 3, Figura 5).

Tabela 2 - Peso materno. Pesos maternos medidos nos 1º, 7º, 14º e 20º dias de prenhez nas ratas do grupo prenhe-estressado ($n=6$) e do grupo prenhe-controle ($n=6$)

		Peso (g)*			
Dia da prenhez		1º dia	7º dia	14º dia	20º dia
Grupos	Prenhe-estressado	224,7±10,9	250,7±15,9	243,7±18,6 ^a	299,8±14,8 ^b
	Prenhe-controle	227,3±10,1	264,7±15,2	294,8±20,9	332,8±26,4

* Valores representam média ± desvio padrão; ^a Diferença significativa em comparação com o grupo controle de mesma idade gestacional ($p=0,005$); ^b Diferença significativa em comparação com o grupo controle de mesma idade gestacional ($p=0,034$).

Tabela 3 - Ganho de peso materno. Diferença de peso materno entre o 1° e o 20° dia de prenhez nas ratas do grupo prenhe-estressado ($n=6$) e do grupo prenhe-controle ($n=6$)

Ganho de Peso Materno	Média $\pm$ DP	Mediana	Mínimo	Máximo
Prenhe-estressado	75,2 $\pm$ 19,8*	78,0	49,0	102,0
Prenhe-controle	105,5 $\pm$ 17,0	98,0	89,0	129,0

* Valor estatisticamente diferente em relação ao controle (* $p=0,025$).

Figura 5 - Representação gráfica, tipo *Box-plot*, do ganho de peso materno entre os grupos estudados. Dados (mediana) dos grupos: prenhe-estressado ($n = 6$) e prenhe-controle ($n = 6$) entre os dias 1 e 20 de gestação (valor em gramas) ($Z=2,242$; * $p=0,025$).

5.1.2 Avaliação dos pesos placentário e fetal

No grupo prenhe-estressado foram obtidos 83 fetos e 83 placentas, enquanto que no grupo prenhe-controle, 84 fetos e 84 placentas. Embora não tenham sido encontradas diferenças entre o número de fetos em ambos os grupos, os pesos fetais variaram significativamente. A média do peso fetal encontrada no grupo prenhe-estressado foi estatisticamente menor do que a observada no grupo controle, (Tabela 4, $*p=0,022$; Figura 6).

Tabela 4 - Peso fetal. O peso dos fetos (média $\pm$ desvio padrão) das ratas do grupo prenhe-estressado ($n=6$) e prenhe-controle ($n=6$) foi obtido aos 20 dias de prenhez (valor em gramas)

<i>Peso fetal</i>	<i>Média $\pm$ DP</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Prenhe-estressado	2,4 $\pm$ 0,3*	2,3	1,7	2,8
Prenhe-controle	2,5 $\pm$ 0,2	2,5	1,7	3,2

* Valor estatisticamente diferente em relação ao controle ($*p=0,022$).

Figura 6 - Representação gráfica, tipo *Box-plot*, dos valores obtidos para o peso fetal (média $\pm$ desvio padrão). O peso dos fetos das ratas do grupo prenhe-estressado ($n=83$) e prenhe-controle ($n=84$) aos 20 dias de prenhez (valor em gramas) ($t=2,318$; $*p=0,022$).

O valor médio das placentas também se mostrou alterado (Tabela 5) sendo significativamente menor nas ratas do grupo prenhe-estressado (Figura 7, $*p<0,001$).

Tabela 5 - Peso placentário. Valor (média $\pm$ desvio padrão) obtido após a pesagem das placentas das ratas do grupo prenhe-estressado ($n=83$) e prenhe-controle ($n=84$) aos 20 dias de prenhez (valor em gramas).

Peso Placentário	Média $\pm$ Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Prenhe-estressado	0,5 $\pm$ 0,07*	0,5	0,3	0,7
Prenhe-controle	0,6 $\pm$ 0,07	0,6	0,3	0,8

* Valor estatisticamente diferente em relação ao controle ($*p<0,001$).

Figura 7 - Representação gráfica, tipo *Box-plot*, dos valores obtidos para o peso placentário (média $\pm$ desvio padrão). Valor médio do peso das placentas das ratas do grupo prenhe-estressado ($n = 83$) e prenhe-controle ($n = 84$) ($t=4,761$, $*p<0,001$).

A relação do peso placentário sobre o peso dos fetos (Tabela 6) mostrou diferenças significativas entre os grupos prenhes controle e estressado (* $p < 0,001$, Figura 8).

Tabela 6 - Razão entre o peso placentário e fetal das ratas do grupo prenhe-estressado ($n=83$) e prenhe-controle ($n=84$) aos 20 dias de prenhez

Peso Placenta/Feto	Média $\pm$ Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Prenhe-estressado	0,21 $\pm$ 0,25*	0,21	0,17	0,25
Prenhe-controle	0,23 $\pm$ 0,30	0,23	0,19	0,24

* Valor estatisticamente diferente em relação ao controle (* $p < 0,001$).

Figura 8. Representação gráfica, tipo *Box-plot*, da razão peso placenta/feto (média $\pm$ desvio padrão) das ratas do grupo estressado ($n=83$) e do grupo controle ($n=84$) ($t=3,948$, * $p < 0,001$).

5.2 Análises Histológicas

A análise das placentas de ratas no 20º dia de gestação mostrou placentas formadas pela decídua mesometrial e as zonas juncional e labiríntica com características normais (Figura 9). Na zona juncional, as células gigantes periféricas faziam contato com pequenas células deciduais. Essas células de grandes dimensões apresentavam o citoplasma de aspecto claro e núcleo de cromatina frouxa, indicando células funcionalmente ativas. Em contato com essas células nas regiões mais profundas da placenta havia ninhos de células do espongiotrofoblasto, representados tanto por células de glicogênio (Figura 9D) como por células de citoplasma basófilo (Figura 9E). No labirinto coriônico, células gigantes e não gigantes trofoblásticas revestiam espaços preenchidos por sangue materno extravasado, enquanto que o sangue fetal corria por capilares fetais (Figuras 9F e 9G).

Figura 9 - Placenta de 20 dias de gestação de rata do grupo controle. (A) A figura mostra uma vista panorâmica da placenta onde podem ser reconhecidas as zonas juncional (ZJ) e labiríntica (ZL). Na interface com a decídua (D) estão as células trofoblásticas gigantes (G). (B-C) Elas se organizam em rede e exibem características de células ativas. (D-E) Com as células gigantes as células do espongiotrofoblasto (e) e de glicogênio (gl) formam a zona juncional. (F-G) No labirinto (L) a barreira placentária (—) separa o sangue fetal (nos capilares fetais, cf) do sangue materno extravasado (*). Células gigantes (G) estão presentes na camada trofoblástica.

Histologicamente não se observaram alterações nas estruturas e regiões placentárias das fêmeas submetidas ao estresse, exceto pela presença de numerosos núcleos picnóticos na decídua em contato com as células trofoblásticas gigantes da zona juncional (Figuras 10A-C) e na região

do labirinto. Nesta região, núcleos picnóticos foram observados principalmente nas células endoteliais dos capilares fetais (Figuras 10F-H) e, eventualmente, nas células mesodérmicas (Figura 10G). Não se observou alteração nuclear ou celular nas células trofoblásticas de nenhuma das regiões placentárias (Figuras 10D-E).

Figura 10 - Placenta de 20 dias de gestação de rata do grupo estresse. (A) A figura mostra uma vista panorâmica da interface de contato das células trofoblásticas gigantes (G) com as células deciduais (D). (B-C) Notar nas figuras B e C núcleos picnóticos nas células deciduais (setas). (D-E) A morfologia das células gigantes (D) e das células do espongiotrofoblasto (E) não apresentaram núcleos picnóticos. (F-H) Na zona do labirinto (L) núcleos picnóticos (setas) podem ser observados nos capilares fetais (F, H) e no mesoderma (G). Fc, capilares fetais; (*) sangue materno extravasado; g, células gigantes do labirinto.

5.3 Expressão gênica das placentas

A expressão do gene VEGF-A em relação ao gene referência β -actina apresentou valor significativamente maior no grupo prenhe-estressado em relação ao grupo prenhe-controle (Tabela 7, $*p=0,025$; Figura 11).

Tabela 7 - Expressão do gene VEGF-A. Valores da expressão do grupo prenhe-estressado ($n=6$) e grupo prenhe-controle ($n=6$)

VEGF-A	Média $\pm$ Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Prenhe-estressado	2,6 $\pm$ 0,3*	2,6	2,1	3,0
Prenhe-controle	1,9 $\pm$ 0,6	2,3	1,0	2,4

* Valor significativamente diferente em relação ao grupo controle, $*p=0,025$.

Figura 11 - Representação gráfica, tipo *Box-plot*, da expressão do gene VEGF-A. Valores obtidos a partir da expressão do RNAm do gene Vegfa em relação ao gene referência β -actina, após a PCR em tempo real entre os grupos prenhe-estressado ($n=6$) e prenhe-controle ($n=6$) ($Z=2,242$; $*p=0,025$).

A expressão do gene VEGFR-1 em relação ao gene referência β -actina apresentou valor significativamente menor no grupo prenhe-estressado em relação ao grupo prenhe-controle (Tabela 8, $*p=0,006$; Figura 12).

Tabela 8 - Expressão do gene VEGFR-1. Valores da expressão deste gene obtidos para o grupo prenhe-estressado ($n=6$) e grupo prenhe-controle ($n=6$)

VEGFR-1	<i>Média $\pm$ Desvio padrão</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Prenhe-estressado	1,7 $\pm$ 0,3*	1,7	1,3	2,2
Prenhe-controle	2,4 $\pm$ 0,3	2,5	1,9	2,6

* Valor significativamente diferente em relação ao grupo controle, $*p=0,006$.

Figura 12 - Representação gráfica, tipo *Box-plot*, da expressão do gene VEGFR-1. Valores quantificados em relação ao gene referência β -actina, após a PCR em tempo real entre os grupos prenhe-estressado ($n=6$) e prenhe-controle ($n=6$) ($Z=2,722$; $*p=0,006$).

A expressão do gene VEGFR-2 em relação ao gene referência β -actina também apresentou valor significativamente menor no grupo prenhe-estressado em relação ao grupo prenhe-controle (Tabela 9, $*p=0,016$; Figura 13).

Tabela 9 - Expressão do gene VEGFR-2. Valores da expressão do grupo prenhe-estressado ($n=6$) e grupo prenhe-controle ($n=6$)

VEGFR-2	Média $\pm$ Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Prenhe-estressado	0,5 $\pm$ 0,1*	0,5	0,4	0,6
Prenhe-controle	0,7 $\pm$ 0,1	0,7	0,5	0,9

* Valor significativamente diferente em relação ao grupo controle, $*p=0,016$.

Figura 13 - Representação gráfica, tipo *Box-plot*, da expressão do gene VEGFR-2. Valores quantificados em relação ao gene referência β -actina, após a PCR em tempo real entre os grupos prenhe-estressado ($n=6$) e prenhe-controle ($n=6$) ($Z=2,402$; $*p=0,016$).

A expressão do gene PIGF em relação ao gene referência β -actina apresentou valor significativamente menor no grupo prenhe-estressado em relação ao grupo prenhe-controle (Tabela 10, $*p=0,025$; Figura 14).

Tabela 10 - Expressão do gene PIGF. Valores da expressão do grupo prenhe-estressado ($n=6$) e grupo prenhe-controle ($n=6$). Valor significativamente menor do grupo prenhe-estressado em relação ao grupo-controle

<i>PIGF</i>	<i>Média $\pm$ Desvio padrão</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Prenhe-estressado	0,8 $\pm$ 0,3*	0,7	0,5	1,3
Prenhe-controle	1,3 $\pm$ 0,5	1,0	0,9	2,1

*Valor significativamente diferente em relação ao grupo controle, $*p=0,025$.

Figura 14 - Representação gráfica, tipo *Box-plot*, da expressão do gene PIGF. Valores quantificados em relação ao gene referência β -actina, após a PCR em tempo real entre os grupos prenhe-estressado ($n=6$) e prenhe-controle ($n=6$) ($Z=2,242$; $*p=0,025$).

A expressão do gene HIF-1 α não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao gene referência β -actina para os grupos prenhe-estressado e prenhe-controle (Tabela 11, $p = 0,298$; Figura 15).

Tabela 11 - Expressão do gene HIF-1 α . Valores obtidos para a expressão do grupo prenhe estressado ($n=6$) e grupo prenhe controle ($n=6$)

<i>HIF-1α</i>	<i>Média $\pm$ Desvio padrão</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Prenhe-estressado	1,2 $\pm$ 0,3	1,1	0,9	1,7
Prenhe-controle	1,5 $\pm$ 0,4	1,5	1,1	2,0

Valores sem diferença estatística entre os grupos, $p=0,298$.

Figura 15 - Representação gráfica, tipo *Box-plot*, da expressão do gene HIF-1 α . Valores quantificados em relação ao gene referência β -actina, após a PCR em tempo real entre os grupos prenhe-estressado ($n=6$) e prenhe-controle ($n=6$) ($Z=1,041$; $p=0,298$).

6 DISCUSSÃO

No mundo moderno, o estresse passa a fazer parte do nosso cotidiano com uma intensidade cada vez maior (Beydoun e Saftlas, 2008). Além disso, durante a gestação a mulher torna-se muito mais sensível e vulnerável aos fatores desencadeadores de estresse (Steiner, 1979; Darnaudéry et al., 2004). Desta forma, avaliar os efeitos desses fatores sobre o organismo materno e fetal pode possibilitar a implementação de medidas eficazes de prevenção ou de atenuação do estresse. Mesmo de grande relevância, é inviável realizar um estudo de tamanha complexidade em seres humanos, na medida em que os efeitos podem incluir morbidade e mortalidade materno-fetal. Neste contexto, o uso de modelos animais torna-se mais adequado, além do que permite a padronização de estímulos estressantes, dentro de limites éticos e a observação de suas repercussões em diferentes níveis no organismo materno e fetal.

Neste estudo foram utilizadas ratas albinas Wistar saudáveis e normotensas, distribuídas nos grupos prenhe-estressado e prenhe-controle, de forma aleatória, após a confirmação de prenhez. O grupo prenhe-estressado foi submetido a condições crônica e aguda de estresse, conforme preconizado por Takiuti et al., em 2002. Segundo os autores, este protocolo é capaz de produzir alterações relevantes na fêmea prenhe, que inclui aumento de pressão sanguínea e da quantidade de proteínas excretadas pela urina, aumento do peso da adrenal, diminuição do

relaxamento vascular e menor peso fetal. Essas alterações não foram detectadas nas fêmeas controle não prenhe. Os efeitos deste tipo de estresse foram semelhantes aos sintomas encontrados em pacientes com pré-eclâmpsia, também uma enfermidade gestacional.

Na primeira etapa foram avaliados os efeitos do estresse sobre diversos parâmetros gestacionais. O ganho de peso materno, um fator de risco para o desenvolvimento fetal, foi avaliado ao longo da gestação. Este parâmetro mostrou alterações relevantes, principalmente durante a aplicação do estresse sônico e de superpopulação (do 7º ao 14º dia de prenhez), que se estendeu até o final da gestação (estresse agudo aos 18 dias da prenhez, imobilização).

Este resultado por si só é de alta relevância, uma vez que fatores indutores de ganho inadequado de peso materno podem ser devido a um desequilíbrio nutricional que, por sua vez, pode acarretar em alteração do genoma placentário, fetal e em sérias conseqüências ao longo da vida da prole (Wu et al., 2004). Caminos et al. (2008) mostraram um severo desequilíbrio na expressão de RNAm de neuropeptídeos derivados da placenta em ratas com desequilíbrio alimentar durante a gestação. Estudos com modelos animais também mostram que alterações na nutrição materna podem reduzir o fluxo sanguíneo placentário na interface materno-fetal, e comprometer o desenvolvimento fetal em diferentes níveis de complexidade (Redmer et al., 2004; Cross e Mickelson, 2006).

Trabalhos prévios mostraram que o estresse crônico ou agudo diminui o ganho de peso materno, diminui a ingestão de alimentos, aumenta o peso

da adrenal (Haris et al., 1998, 2002) e ainda diminui os cuidados maternos com a prole (Baker et al., 2008). Por outro lado, ratos submetidos a estímulo sônico semelhante ao utilizado nesta pesquisa, diminuíram a ingestão alimentar e aumentaram a frequência das evacuações (Krebs et al., 1996). Em humanos, também se observa que fatores estressantes de caráter emocional podem estar associados com perda de peso durante a gestação, o que traz riscos tanto para a mãe quanto para o feto (Cohen e Kim, 2009).

Estresses e lesões gástricas têm sido relatados na literatura e, talvez, seja o principal mecanismo de hipofagia associado a este distúrbio (Brzozowski et al., 2007; Izgüt-Uysal et al., 2007; Konturek et al., 2008).

Embora não tenham sido empregados métodos específicos para avaliar as causas da redução de ganho de peso nas fêmeas submetidas ao estresse, é possível inferir que a diminuição na ingestão de alimentos tenha sido um dos fatores responsáveis pelas diferenças no ganho de peso das fêmeas prenhes estressadas em nosso estudo.

O peso fetal ao fim da gestação é um dos mais importantes parâmetros relacionados à morbidade e mortalidade infantil nas diferentes espécies (Cabreara et al., 1999; Bernstein et al., 2000; Garite et al., 2004; Baxter et al., 2008). Nossos resultados sobre o peso fetal sugerem que a redução no ganho de peso materno, ou o próprio estresse, comprometeram o desenvolvimento fetal, reduzindo significativamente o peso, mas não a viabilidade fetal. O número de fetos obtidos nas fêmeas estressadas foi numericamente comparável ao dos animais controle. Conforme já exposto anteriormente, é possível que a redução de ingestão alimentar pelas fêmeas

prenhes estressadas tenha causado deficiências protéicas sérias no organismo materno, como as mostradas por Rudge et al. (1999) em ratos, levando a um menor desenvolvimento fetal.

Esta redução no peso fetal pode estar associada a conseqüências de suma importância, não só durante o período pré/pós-natal, mas também ao longo da vida do indivíduo. Experimentos com ratos que tiveram restrição de crescimento intra-uterino associado ao estresse materno mostraram que os indivíduos, quando adultos, submetidos a fatores estressantes apresentam uma maior resposta adreno-cortical, aumento do peso da adrenal e alterações cardíacas em relação a indivíduos do grupo controle (Mastorci et al., 2009).

Em outros estudos, estresse materno alterou significativamente o peso corporal e a função endócrina fetal (Mairesse et al., 2007) observada também pela redução do peso da adrenal, pâncreas e testículos. As alterações fetais foram relacionadas com a redução da massa de células β pancreáticas, níveis de glicose no sangue e hormônios de crescimento.

A julgar pelos dados da literatura, é provável que em nossos estudos as proles das fêmeas estressadas também tivessem sua fisiologia comprometida irreversivelmente. Os dados obtidos neste estudo quanto ao peso placentário também foram concordantes com a literatura. Estudos onde os ratos foram induzidos a hipertermia (41-42° C, 1h por dia, durante a gestação), notaram-se um retardo de crescimento intra-uterino, uma relevante redução no peso das placentas, além de muitas mal-formações craniofaciais (Padmanabhan et al., 2005). Esses dados eram esperados, uma vez que o

peso placentário, via de regra, é proporcional ao índice de massa corporal materna (Sanin Aguirre et al., 2004; Swanson e Bewtra, 2008).

Funcionalmente um menor peso placentário se relaciona a uma redução do tecido funcional deste órgão, o que significa uma diminuição da área de troca entre a mãe e o feto, que pode ocorrer tanto na área da superfície vilosa como na área da superfície capilar fetal. Assim, a habilidade de transferir oxigênio e nutrientes da mãe ao feto é diminuída. Resultados de estudos morfométricos da placenta mostram que o crescimento fetal pode ser limitado pela função placentária, assim como o seu peso. Dessa forma, baixo peso placentário tem sido utilizado como preditor de crescimento fetal alterado (Bleker et al., 2006). Embora a restrição fetal possa estar associada ao tamanho da placenta, independentemente do estado nutricional materno (Quigley et al., 2008), ressalte-se que neste estudo as fêmeas estressadas apresentaram peso reduzido em relação às normais, o que pode ter se refletido diretamente no peso placentário.

Obviamente alterações no peso fetal e/ou placentário como as observadas em casos de desnutrição (Pivalizza et al., 1990; Godfrey e Barker, 1995), infecções (Gichangi et al., 1993), hipertensão (Naeye, 1987), altitude (Krueger e Arias-Stella, 1970; Khalid et al., 1997) e hipoxia aguda (Naeye, 1987), entre outros também alteram a razão placenta: o feto. Durante a pesquisa, observamos uma redução nesta relação no grupo de animais estressados, o que pode ser, assim como observado em outros estudos (Levy e Jackson, 1993), uma consequência direta da ingestão alimentar alterada, causando diferenças no peso fetal e placentário e conseqüentemente na razão placenta: o feto.

A análise histológica das placentas do grupo de animais submetidos ao estresse mostrou poucas alterações relevantes. Apesar das diferenças no peso placentário, a estrutura geral deste órgão foi preservada tanto em sua face fetal como a materna. Todos os componentes placentários estavam presentes e sua organização foi semelhante à observada nos grupos controle. No entanto, as amostras de placentas das fêmeas prenhes estressadas mostraram a presença de numerosos núcleos de cromatina extremamente condensada na decídua em contato com as células trofoblásticas gigantes da zona juncional, e nas células endoteliais dos capilares da região do labirinto. Esta alteração de padrão morfológico nuclear parece indicar o estabelecimento de um processo degenerativo nestas células, do tipo apoptótico. Conforme descrito por Zhivotosky e Orrenius (2001), células apoptóticas apresentam redução das dimensões celulares, condensação nuclear e formação de corpos picnóticos de cromatina condensada, diferentemente das células necróticas, que exibem núcleo dilatado e edemaciado, cromatina floculenta e perda da basofilia nuclear.

A redução do peso placentário pode, desta forma, ser o reflexo da indução desse processo degenerativo nas placentas das fêmeas estressadas. Este é, sem dúvida, um aspecto de importância neste estudo e que deverá ser mais bem investigado em experimentos futuros.

Resumidamente, os níveis de estresse gerados durante a gestação têm sido diretamente correlacionados a alterações na fisiologia materna e nas funções das células do sistema imunológico, tornando-se um fator de

risco para as complicações gestacionais. Em ratas, a utilização de estímulos estressantes durante a gestação também provoca alterações significativas, dentre as quais se destaca a restrição de crescimento fetal (Kanayama et al., 1997, Khatun et al., 1999; Takiuti et al., 2002 e nossos resultados), acompanhada de alterações expressivas de pressão, proteinúria, aumento de peso da adrenal, diminuição do relaxamento vascular, diminuição da invasão trofoblástica, congestão e aumento dos depósitos sub-endoteliais de fibrinóide nos capilares glomerulares, além de intenso estímulo do sistema nervoso simpático, uma sintomatologia semelhante à observada em gestantes pré-eclâmplicas.

A fisiopatologia da pré-eclâmpsia é caracterizada pela hipertensão, proteinúria, restrição de crescimento fetal e menor tamanho placentário (Odegard et al., 2000). Essas alterações estão previamente descritas no modelo animal utilizado. Sendo multifatorial e com uma etiopatogenia desconhecida, a falha da invasão trofoblástica e o desbalanço de fatores angiogênicos parecem ser pivô para a patologia (Redman e Sargent, 2005).

Por outro lado, através da técnica de Doppler, têm se observado que as gestações com restrição de crescimento fetal coexistem com uma redução na vascularização das vilosidades placentárias, que apresentam menor número de vasos arteriais. Neste contexto, as alterações vasculares seriam um(a) causa/efeito de suma importância, contribuindo diretamente com a redução no aporte de oxigênio e transferência de nutrientes e, portanto restringindo o crescimento e desenvolvimento fetal (Sagol et al., 2002).

Em nosso estudo, este aspecto foi abordado a partir da análise da expressão do RNAm dos genes dos fatores angiogênicos VEGF-A e PlGF e seus receptores, VEGFR-1 e VEGFR-2. Sendo esses fatores regulados por diversos sistemas e, principalmente, pela hipoxia, verificamos também a expressão do gene HIF-1 α , cuja transcrição é oxigênio-dependente. Sendo assim, sua expressão é aumentada em condições de hipoxia (Lee et al., 2004).

Observamos que a expressão gênica de VEGF-A foi significativamente maior no grupo que sofreu estímulos estressantes, ao contrário de PlGF e dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, que tiveram suas expressões sensivelmente diminuídas neste grupo.

Neste estudo, mais do que a expressão deste fator de crescimento e seus receptores, o que notamos é a atípica relação entre ambos nas fêmeas estressadas. Enquanto que o aumento de expressão de VEGF-A poderia significar uma tentativa compensatória de aumentar o leito vascular das fêmeas estressadas, de modo a melhorar as condições na interface materno-fetal, a significativa redução na expressão dos receptores não favorece esta idéia.

Não existem trabalhos correlacionando diretamente estresse exagerado na gestação e fatores angiogênicos tanto em placentas humanas como de ratas.

O modelo animal de estresse utilizado no presente estudo é sugerido como uma forma de se avaliar a fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

Neste estudo, foi observada diminuição dos receptores VEGFR-1, VEGFR-2 e do gene PlGF no modelo animal, o que poderia sugerir uma

redução da angiogenese e da vasculogenese placentárias de pacientes com pré-eclâmpsia. Assim, o tamanho da placenta também reduziria, o que poderia repercutir com redução do crescimento fetal. Foi observado ainda aumento da expressão do gene VEGF-A, o que poderia ser explicado por uma provável tentativa compensatória na placenta.

Observações sobre a expressão de VEGF em placentas de pacientes com pré-eclâmpsia são conflitantes na literatura (Cooper et al., 1996; Ranheim et al., 2001; Rajakumar et al., 2007; Caniggia e Winter, 2002; Geva et al., 2002; Trollmann et al., 2003; Chung et al., 2004; Sgambati et al., 2004; Soleymanlou et al., 2005; Zhou et al., 2006; Marini et al., 2007; Enquobahrie et al., 2008). Assim, novos estudos clínicos com critérios diagnósticos melhor definidos de pré-eclâmpsia se tornam necessários para comprovar essas alterações angiogênicas placentárias na fisiopatologia dessa doença, ou mesmo em gestantes submetidas ao estresse.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo tem como conclusões:

1. Quanto aos parâmetros gestacionais avaliados, observa-se diminuição no ganho de peso materno, do peso placentário, do peso fetal e da relação peso placenta/feto em ratas do grupo prenhe-estressado em relação ao grupo prenhe-controle ao 20º dia da prenhez;
2. Quanto às alterações histológicas, foram detectadas características degenerativas nas placentas do grupo prenhe-estressado em relação ao controle;
3. Observou-se maior expressão de RNAm do gene VEGF-A e menor expressão dos RNAm de VEGFR-1, VEGFR-2 e PIGF nas placentas de ratas do grupo prenhe-estressadas em relação ao grupo prenhe-controle, mas não houve diferença na expressão gênica do HIF-1 α .

8 ANEXOS

Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da instituição.

Ref. Carta datada de 21.06.07

AO**DEPARTAMENTO DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 19.07.07, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **0394/07**, intitulado: **"DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES ANGIOGÊNICOS EM MODELO ANIMAL DE PRÉ-ECLÂMPSIA ASSOCIADO AO ESTRESSE"**; será dissertação de mestrado da Sra. Isis Paloppi Corrêa, tendo como orientador Dr. Rodrigo Ruano.

CAPPesq, 19 de julho de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo B – Alteração do projeto de pesquisa para tese de Doutorado. **CIÊNCIA**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30/01/2008, **TOMOU CIÊNCIA do(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **0394/07**, intitulado: **"DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES ANGIOGÊNICOS EM MODELO ANIMAL DE PRÉ-ECLÂMPSIA ASSOCIADO AO ESTRESSE"** apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

•Carta datada de 05/12/07 - alteração no Projeto de Pesquisa, especificação da finalidade acadêmica da pesquisa: Pós-Graduação – Doutorado- Pesquisador Responsável: Dr. Rodrigo Ruano, Pesquisador Executante Isis Paloppi Corrêa, Orientador: Dr. Rodrigo Ruano, e manutenção dos co-autores: Nilton Hideto Takiuti, Estela Bevilacqua e Marcelo Zugaib

CAPPesq, 30 de Janeiro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Anexo C – Os *primers* para amplificação dos cDNA foram desenhados conforme procedimento descrito anteriormente, sendo selecionados os que melhor se ajustaram aos parâmetros avaliados.

Gene		<i>Primer</i>	n.acesso
VEGF	S	CAGCACATAGGAGAGATGAGCTTC	NM_031836.1
	AS	GTCTGCGGATCTTGGACAAA	
VEGFR-1	S	CAGAGCCAGGAACATATACACAGG	NM_019306.1
	AS	CGTGGTCACTGAGGTTTTGAAG	
VEGFR-2	S	CTAGTCAAGCAGCTCGTCATCCTA	NM_013062.1
	AS	GCCTGAATCTTCTACAAGGGTCTC	
HIF-1 α	S	CTACAAGAAACCGCCTATGACG	NM_024359.1
	AS	GGCTCATAACCCATCAACTCAG	
PIGF	S	ATGTGTCCTTCTGAGTCGCTGTAG	NM_053595
	AS	CTGCCTTTGTCTGTCTCCAGAATAG	
β -Actina	S	ACCCGCGAGTACAACCTTCT	NM_031144
	AS	GCAGCGATATCGTCATCCAT	

S, *primer sense*

AS, *primer anti-sense*

9 REFERÊNCIAS

Ahmed A, Li XF, Dunk C, Whittle MJ, Rushton DI, Rollason T. Colocalization of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors*. 1995;12:235-43.

Ain R, Canham LN, Soares MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol*. 2003;260:176-90.

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as survival factor for retinopathy of prematurity. *Nat Med*. 1995 Oct;1(10):1024-8.

Altun ZS, Uysal S, Guner G, Yilmaz O, Posaci C. Effects of oral L-arginine supplementation on blood pressure and asymmetric dimethylarginine in stress-induced preeclamptic rats. *Cell Biochem Funct*. 2008 Sep-Oct;26(5):648-53.

Altura BM, Altura BT, Gebrewold A, Ising H, Günther T. Noise-induced hypertension and magnesium in rats: relationship to microcirculation and calcium. *J Appl Physiol*. 1992 Jan;72(1):194-202.

Arora KL, Cohen BJ, Beaudoin AR. Fetal and placental responses to artificially induced hyperthermia in rats. *Teratology*. 1979 Apr;19(2):251-9.

Baker S, Chebli M, Rees S, Lemarec N, Godbout R, Bielajew C. Effects of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. *Brain Res*. 2008 Jun 5;1213:98-110.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996 Apr 15;87(8):3336-43.

Baxter EM, Jarvis S, D'Eath RB, Ross DW, Robson SK, Farish M, Nevison IM, Lawrence AB, Edwards SA. Investigating the behavioural and physiological indicators of neonatal survival in pigs. *Theriogenology*. 2008 Apr 1;69(6):773-83.

Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessel by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:8761-6.

Bernátová I, Púzserová A, Navarová J, Csizmadiová Z, Zeman M. Crowding-induced alterations in vascular system of Wistar-Kyoto rats: role of nitric oxide. *Physiol Res*. 2007;56(5):667-9.

Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol*. 2000 Jan;182(1 Pt 1):198-206.

Beydoun H, Saftlas AF. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2008 Sep;22(5):438-66.

Black KD. Stress, symptoms, self-monitoring, confidence, well-being, and social support in the progression of preeclampsia/gestational hypertension. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2007; 36:419-29.

Bleker OP, Buimer M, van der Post JA, van der Veen F. Ted (G.J.) Kloosterman: on intrauterine growth. The significance of prenatal care. Studies on birth weight, placental weight and placental index. *Placenta*. 2006 Nov-Dec;27(11-12):1052-4.

Breier G. Angiogenesis in embryonic development – a review. *Placenta*. 2000;21(Suppl A):S11-S15.

Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial cell differentiation. *Development*. 1992;114:521-32.

Breier G, Damert A, Plate KH, Risau W. Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemost*. 1997 Jul;78(1):678-83.

Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, Isner JM. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest*. 1996 Jan 15;97(2):469-76.

Brzozowski T, Zwirska-Korczala K, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pawlik M, Kwiecien S, Drozdowicz D, Mazurkiewicz-Janik M, Bielanski W, Pawlik WW. Role of circadian rhythm and endogenous melatonin in pathogenesis of acute gastric bleeding erosions induced by stress. *J Physiol Pharmacol*. 2007 Dec;58 Suppl 6:53-64.

Cabrera RJ, Rodríguez-Echandía EL, Jatuff AS, Fóscolo M. Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior. *Braz J Med Biol Res*. 1999 Oct;32(10):1229-37.

Caluwaerts S, Vercruysse L, Luyten C, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta*. 2005;26:574-84.

Caminos JE, Bravo SB, González CR, Garcés MF, Cepeda LA, González AC, Cordido F, López M, Diéguez C. Food-intake-regulating-neuropeptides are expressed and regulated through pregnancy and following food restriction in rat placenta. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008 Apr 2;6:14.

Caniggia I, Winter JL. Adriana and Luisa Castellucci Award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies--a review. *Placenta*. 2002 Apr;23 Suppl A:S47-57.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):435-9.

Chakraborty I, Das SK, Dey SK. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *J Endocrinol*. 1995 Nov;147(2):339-52.

Chaouloff F, Zamfir O. Psychoneuroendocrine outcomes of short-term crowding stress. *Physiol Behav*. 1993 Oct;54(4):767-70.

Chung JY, Song Y, Wang Y, Magness RR, Zheng J. Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 May;89(5):2484-90.

Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AL, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol.* 1998 Dec;159(3):459-67.

Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1535-45.

Cohen JH, Kim H. Sociodemographic and health characteristics associated with attempting weight loss during pregnancy. *Prev Chronic Dis.* 2009 Jan;6(1):A07.

Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996 Dec;103(12):1191-6.

Coussons-Read ME, Okun ML, Nettles CD. Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy. *Brain Behav Immun.* 2007;21:343-50.

Cross, JC. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18:71-6.

Cross JC, Mickelson L. Nutritional influences on implantation and placental development. *Nutr Rev.* 2006 May;64(5 Pt 2):S12-8.

Dahl KDC, Fryer BH, Mack FA, Compennolle V, Maltepe E, Adelman DM, Carmeliet P, Simon MC. Hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α regulate trophoblast differentiation. *Mol Cell Biol*. 2005;10479-91.

Darnaudéry M, Dutriez I, Viltart O, Morley-Fletcher S, Maccari S. Stress during gestation induces lasting effects on emotional reactivity of the dam rat. *Behav Brain Res*. 2004 Aug 12;153(1):211-6.

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 1992 Feb 21;255(5047):989-91.

Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, Nadaf S, Carbone DP. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol*. 2005 Jan 1;174(1):215-22.

DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, et al. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor/placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem*. 1995;270:7717-23.

Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn*. 1995;203:80-92.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995 May;146(5):1029-39.

Enquobahrie DA, Meller M, Rice K, Psaty BM, Siscovick DS, Williams MA. Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Nov;199(5):566.e1-11.

Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, Fleet C, Tritsarlis K, Dissing S, Leboulch P, Cao Y. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell*. 2002 Feb;1(1):99-108.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrinol Rev*. 2004;25:581-611.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial Growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18:4-25.

Ferrara N, Gerber HP, LeCounter J. The biology of VEGF and this receptors. *Nat Med*. 2003;9:669-76.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):66-70.

Friedman SA, Taylor RN, Roberts JM. Pathophysiology of preeclampsia. *Clin Perinatol*. 1991 Dec;18(4):661-82.

Gamallo A, Villanua A, Trancho G, Fraile A. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol Behav*. 1986;36(2):217-21.

Gardner RL. Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse. *Int Rev Exp Pathol*. 1983;24:63-133.

Garite TJ, Clark R, Thorp JA. Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Aug;191(2):481-7.

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273:13313-6.

Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Sep;87(9):4213-24.

Gichangi PB, Nyong'o AO, Temmerman M. Pregnancy outcome and placental weights: their relationship to HIV-1 infection. *East Afr Med J*. 1993 Feb;70(2):85-9.

Gille H, Kowalski J, Li B, LeCounter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). *J Biol Chem*. 2001;276:3222-30.

Godfrey KM, Barker DJ. Maternal nutrition in relation to fetal and placental growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1995 Jul;61(1):15-22.

Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;187:233-8.

Haelterman E, Marcoux S, Croteau A, Dramaix M. Population-based study on occupational risk factors for preeclampsia and gestational hypertension. *Scand J Work Environ Health*. 2007; 33:304-17.

Harris RB, Mitchell TD, Simpson J, Redmann SM Jr, Youngblood BD, Ryan DH. Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Jan;282(1):R77-88.

Harris RB, Zhou J, Youngblood BD, Rybkin II, Smagin GN, and Ryan DH. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 1998;275: R1928-38.

Hoshida MS, Gorjão R, Lima C, Daher S, Curi R, Bevilacqua E. Regulation of gene expression in mouse trophoblast cells by interferon-gamma. *Placenta*. 2007 Oct; 28(10):1059-72.

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:7987-92.

Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem*. 1995;270:19761-6.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Genes Dev*. 1998;12:149–162.

Izgüt-Uysal VN, Bülbül M, Tan R, Derin N, Ustünel I, Açar A, Yargıçoğlu P. Effect of chronic stress and L-carnitine on rat stomach. *J Physiol Sci*. 2007 Jun;57(3):187-92.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindal ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292:468-72.

Jakeman LB, Armani B, Phillips HS, Ferrara N. Developmental expression of binding sites and mRNA for vascular endothelial growth factor suggest a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology*. 1993;133:848-59.

Janota J, Pomyje J, Toth D, Sosna O, Zivny J, Kuzel D, Stranak Z, Necas E, Zivny JH. Expression of angiopoietic factors in normal and type-I diabetes human placenta: a pilot study. *Eur J Obstet Reprod Biol*. 2003;111:153-6.

Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol*. 2003;162:115-25.

Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*. 2000;157:2111-22.

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 1997;276:1423-5.

Jojovic M, Wolf F, Mangold U. Epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor and progesterone promote placental development in rat whole-embryo culture. *Anat Embryol*. 1998;198:133-9.

Jollie WP. Age changes in the fine structure of rat trophoblast giant-cells. *Anat Embryol (Berl)*. 1981;162(1):105-19.

Jollie WP. Changes in the fine structure of the parietal yolk sac of the rat placenta with increasing gestational age. *Am J Anat*. 1968 May;122(3):513-31.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 1996;15:290-8.

Kaipainen A, Korhonen J, Pajusola K, Aprelikova O, Persico MG, Terman BI, Alitalo K. The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):2077-88.

Kanayama N, Tsujimura R, She L, Maehara K, Terao T. Cold-induced stress stimulates the sympathetic nervous system, causing hypertension and proteinuria in rats. *J Hypertens*. 1997;Apr;15(4):383-9.

Kawakami M, Furuhashi T, Kimura Y, Yamaguchi K, Hata F, Sasaki K, Hirata K. Expression analysis of vascular endothelial growth factors and their relationships to lymph node metastasis in human colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2003 Jun;22(2):229-37.

Khalid ME, Ali ME, Ali KZ. Full-term birth weight and placental morphology at high and low altitude. *Int J Gynaecol Obstet*. 1997 Jun;57(3):259-65.

Khatun S, Kanayama N, Belayet HM, Masui M, Sugimura M, Kobayashi T, Terao T. Induction of preeclampsia like phenomena by stimulation of sympathetic nerve with cold and fasting stress. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999 Sep;86(1):89-97.

Khatun S, Kobayashi T, Belayet H, Sumimoto K, Iwaki T, Kanayama N. Local cold stress to the soles induces retroplacental hemorrhage in rats. *Semin Thromb Hemost.* 2001;27(2):79-86.

Klonoff-Cohen HS, Cross JL, Pieper CF. Job stress and preeclampsia. *Epidemiology.* 1996;7:245-9.

Komitowski D, Muto S, Weiss J, Schmitt B, Taylor GT. Structural changes in nuclear chromatin in rat pituitary after chronic stress of low intensity. *Anat Rec.* 1988 Feb;220(2):125-31.

Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek PC, Zwirska-Korczala K, Reiter RJ. Day/night differences in stress-induced gastric lesions in rats with an intact pineal gland or after pinealectomy. *J Pineal Res.* 2008 May;44(4):408-15.

Krebs H, Macht M, Weyers P, Weijers HG, Janke W. Effects of stressful noise on eating and non-eating behavior in rats. *Appetite.* 1996 Apr;26(2):193-202.

Krüger H, Arias-Stella J. The placenta and the newborn infant at high altitudes. *Am J Obstet Gynecol.* 1970 Feb 15;106(4):586-91.

Landsbergis PA, Hatch MC. Psychosocial work stress and pregnancy-induced hypertension. *Epidemiology.* 1996;7:346-51.

Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;29;36(1):1-12.

Leeners B, Neumaier-Wagner P, Kuse S, Stiller R, Rath W. Emotional stress and the risk to develop hypertensive diseases in pregnancy. *Hypertens Pregnancy*. 2007;26(2):211-26.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989 Dec 8;246(4935):1306-9.

Levy L, Jackson AA. Modest restriction of dietary protein during pregnancy in the rat: fetal and placental growth. *J Dev Physiol*. 1993 Mar;19(3):113-8.

Li B, Ogasawara AK, Yang R, Wei W, He G-W, Zioncheck TF, Bunting S, Vos AM, Jin H. KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effects of VEGF. *Hypertension*. 2002;39:1095-1100.

Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, Flk-1 and Flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol*. 1996;270:H1803-11.

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:9267-71.

Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Jun;292(6):E1526-33.

Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS. Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996 May 10;271(19):11500-5.

Marini M, Vichi D, Toscano A, Zappoli Thyron GD, Parretti E, Mello G, Gheri G, Pacini A, Sgambati E. Expression of vascular endothelial growth factor receptor types 1, 2 and 3 in placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *Reprod Fertil Dev*. 2007;19(5):641-51.

Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chain activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*. 2001 Sep 17;20(18):5197-206.

Mastorci F, Vicentini M, Viltart O, Manghi M, Graiani G, Quaini F, Meerlo P, Nalivaiko E, Maccari S, Sgoifo A. Long-term effects of prenatal stress: Changes in adult cardiovascular regulation and sensitivity to stress. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33(2):191-203.

Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001 Dec 11;2001(112):RE21.

Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9026-30.

McColl BK, Stacker SA, Achen MG. Molecular regulation of the VEGF family – inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS*. 2004;463-80.

McMahon, G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist*. 2000;5 Suppl 1:3-10.

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Büttner M, Rziha HJ, Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 1999 Jan 15;18(2):363-74.

Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R et al. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem*. 1998;273:22272-8.

Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest*. 1994;71:374-9.

Naeye RL. Do placental weights have clinical significance? *Hum Pathol*. 1987 Apr;18(4):387-91.

Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther*. 2006;19(1):61-9.

National Center for Biotechnology Information. NCBI. Nucleotide sequences. *U.S. National Library of Medicine*. Revised: July 23, 2008. [Internet]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999 Jan;13(1):9-22.

Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS*. 1997;105:417-37.

Odegard RA., Vatten LJ, Nilsen ST., Salvesen KA, Austgulen R. Preeclampsia and Fetal Growth. *Obstet Gynecol.* 2000;96:950 –5.

Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L, et al. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J Cell Sci.* 2002;115:2559-67.

Ohkawa T, Takeshita S, Murase T, Kambegawa A, Okinaga S, Arai K. Ontogeny of the response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to maternal immobilization stress in rats. *Endocrinol Jpn.* 1991;Apr;38(2):187-94.

Osol G, Celia G, Gokina N, Barron C, Chien E, Mandala M, Luksha L, Kublichien K. Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H1381-7.

Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis.* 2007 May-Jun;38(3):258-68.

Padmanabhan R, Al-Menhali NM, Ahmed I, Kataya HH, Ayoub MA. Histological, histochemical and electron microscopic changes of the placenta induced by maternal exposure to hyperthermia in the rat. *Int J Hyperthermia.* 2005 Feb;21(1):29-44.

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994;269:25646-54.

Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee M-E, Haber E. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptor by tumor necrosis factor- α in cultured human vascular endothelial cell. *J Clin Invest*. 1996;98:490-6.

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

Pfaffl, MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:2002-7.

Pijnenborg R, Aplin JD, Ain R, Bevilacqua E, Bulmer JN, Cartwright J, Huppertz B, Knofler M, Maxwell C, Vercruysse L. Trophoblast and the endometrium – A workshop report. *Placenta*. 2004;25(Suppl A):S42-4.

Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G. Trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta*. 1981;2:71-92.

Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. Fetal-maternal conflict, trophoblast invasion, preeclampsia, and the red queen. *Hypertens Pregnancy*. 2008;27(2):183-96.

Pivalizza PJ, Woods DL, Sinclair-Smith CC, Kaschula RO, Pivalizza EG. Placentae of light for dates infants born to underweight mothers at term: a morphometric study. *Placenta*. 1990 Mar-Apr;11(2):135-42.

Quigley SP, Kleemann DO, Walker SK, Speck PA, Rudiger SR, Nattrass GS, DeBlasio MJ, Owens JA. Effect of variable long-term maternal feed allowance on the development of the ovine placenta and fetus. *Placenta*. 2008 Jun;29(6):539-48.

Rajakumar A, Conrad KP. Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biol Reprod*. 2000;63:559-69.

Rajakumar A, Doty K, Daftary G, Conrad KP. Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 α and -2 α proteins in pre-eclampsia placentae. *Placenta*. 2003;24:199-208.

Rajakumar A, Jeyabalan A, Markovic N, Ness R, Gilmour C, Conrad KP. Placental HIF-1 α , HIF-2 α , membrane and soluble VEGF receptor-1 proteins are not increased in normotensive pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Aug;293(2):R766-74.

Rajakumar A, Whitelock KA, Weissfeld LA, Daftary AR, Markovic N, Conrad KP. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2 α , in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod*. 2001 Feb;64(2):499-506.

Ranheim T, Staff AC, Henriksen T. VEGF mRNA is unaltered in decidual and placental tissues in preeclampsia at delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001 Feb;80(2):93-8.

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

Redmer DA, Wallace JM, Reynolds LP. Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Domest Anim Endocrinol*. 2004 Oct;27(3):199-217.

Regnault TRH, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies - a review. *Placenta*. 2002;23(Suppl A):S119-29.

Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1992;80:283-5.

Rondó PH, Ferreira RF, Nogueira F, Ribeiro MC, Lobert H, Artes R. Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. *Eur J Clin Nutr*. 2003 Feb;57(2):266-72.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365-86.

Rudge MV, Gomes CM, Calderon Ide M, Ramos MD, Abbade JF, de Oliveira MG, da Silva MG. Study of the evolution of the placenta and fetal pancreas in the pathophysiology of growth retardation intrauterine due to restricted maternal diet. *Sao Paulo Med J*. 1999 Mar 4;117(2):49-56.

Sağol S, Sağol O, Ozdemir N. Stereological quantification of placental villus vascularization and its relation to umbilical artery Doppler flow in intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn*. 2002 May;22(5):398-403.

Salceda S, Caro J. Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997;272:22642-7.

Sanin Aguirre LH, Reza-López S, Levario-Carrillo M. Relation between maternal body composition and birth weight. *Biol Neonate*. 2004;86(1):55-62.

Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 2001 Feb 1;97(3):785-91.

Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1515-24.

Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1. mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:47-53.

Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:993-8.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):983-5.

Sgambati E, Marini M, Zappoli Thyron GD, Parretti E, Mello G, Orlando C, Simi L, Tricarico C, Gheri G, Brizzi E. VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *BJOG*. 2004 Jun;111(6):564-70.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):62-6.

Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fertil*. 1993 Nov;99(2):609-15.

Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2001;26:25-35.

Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L. Structure and function of VEGF receptor-1 and -2. *Curr Topics Microbiol Immunol*. 1999;237:59-83.

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. 1990 Apr;5(4):519-24.

Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, Post M, Caniggia I. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jul;90(7):4299-308.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):735-45.

Srivastava RK, Gu Y, Ayloo S, Zilberstein M, Gibori G. Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line. *J Mol Endocrinol*. 1998 Dec;21(3):355-62.

Steiner M. Psychobiology of mental disorders associated with childbearing. *Acta Psychiatr. Scand.* 1979;60, 449–64.

Swanson LD, Bewtra C. Increase in normal placental weights related to increase in maternal body mass index. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008 Feb;21(2):111-3.

Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J Biol Chem.* 2005 Jan 21;280(3):2126-31.

Takeda T, Sakata M, Isobe A, Yamamoto T, Nishimoto F, Minekawa R, Okamoto Y, Tasaka K, Murata Y. Hypoxia represses the differentiation of rcho-1 rat trophoblast giant cell. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;63:188-94.

Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. Stress in pregnancy: a new Wistar rat model for human preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Mar;186(3):544-50.

Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. Stress-related preeclampsia: an evolutionary maladaptation in exaggerated stress during pregnancy? *Med Hypotheses.* 2003; 60:328-31.

Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1991;Sep;6(9):1677-83.

Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, Torry RJ. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig.* 2003 May;10(4):178-88.

Triche EW, Hossain N. Environmental factors implicated in the causation of adverse pregnancy outcome. *Semin Perinatol*. 2007 Aug;31(4):240-2.

Trollmann R, Amann K, Schoof E, Beinder E, Wenzel D, Rascher W, Dötsch J. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Feb;188(2):517-23.

Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or chronic hypoxia. *J Clin Invest*. 1995;95:1798-1807.

Vercruysse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta*. 2006;27:22-33.

Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, Alitalo K, Halmesmaki E. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reproduct*. 1997;56:489-94.

Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation*. 1996 Oct 1;94(7):1647-54.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:5510-4. 1995.

Welsh AO, Endres AC. Chorioallantoic placenta formation in the rat: II. Angiogenesis and maternal blood circulation in the mesometrial region of the implantation chamber prior to placental formation. *Am J Anat.* 1991;192:347-65.

Welsh AO, Endres AC. Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat Rec.* 1987;217:203-19.

World Health Organization. World Health Report: make every mother and child count. Geneva: WHO; 2005.

Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr.* 2004 Sep;134(9):2169-72.

Yamazaki K, Endo T, Kitajima Y, Manase K, Nagasawa K, Honnma H, Hayashi T, Kudo R, Saito T. Elevation of both cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ receptor EP3 expressions in rat placenta after uterine artery ischemia-reperfusion. *Placenta.* 2006;27:395-401.

Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T. Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. *Biochemistry.* 2005 Jun 21;44(24):8858-64.

Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9630-5.

Zhivotosky B, Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001 Nov;Chapter 18:Unit 18.3.

Zhou R, Zhu Q, Wang Y, Ren Y, Zhang L, Zhou Y. Genomewide oligonucleotide microarray analysis on placentae of pre-eclamptic pregnancies. *Gynecol Obstet Invest*. 2006;62:108–14.

Zugaib M, Kahhale S. Conceito, classificação e incidência das síndromes hipertensivas na gestação. *Gin Obst Bras*. 1985;8:239-44.