

LUCIANA PIETRO

**FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL
VASCULAR (VEGF) NA PLACENTA DE GESTANTES
COM HIPERGLICEMIA LEVE**

TESE APRESENTADA AO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE **MESTRE EM CIÊNCIAS**.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL

SÃO PAULO

2008

LUCIANA PIETRO

**FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL
VASCULAR (VEGF) NA PLACENTA DE GESTANTES
COM HIPERGLICEMIA LEVE**

TESE APRESENTADA AO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DA UNIERSIDADE DE SÃO PAULO, PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE **MESTRE EM CIÊNCIAS.**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL

ORIENTADORA:
PROF^a DR^a ESTELA BEVILACQUA

SÃO PAULO

2008

RESUMO

PIETRO, L. **Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na placenta de gestantes com distúrbios hiperglicêmicos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Histologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Distúrbios hiperglicêmicos podem incluir diferentes condições tais como a diabetes clínica e gestacional e a hiperglicemia leve, classificadas principalmente de acordo com as alterações no teste de tolerância à glicose ou do perfil glicêmico. Enquanto a diabetes tem recebido considerável atenção nos últimas décadas, somente poucos estudos têm focado os mecanismos e distúrbios associados à hiperglicemia leve. Entretanto, a hiperglicemia leve está associada à macrossomia e à altos índices de mortalidade perinatal. Morfologicamente, a placenta destas mulheres é caracterizada pelo relevante aumento no número de vilos terminais e vasos vilosos a eles associados, o que tem sido atribuído a uma condição compensatória para a manutenção da homeostasia na interface materno-fetal. Este estudo analisou a participação do VEGF e dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 em placentas de mulheres diagnosticadas como hiperglicêmicas leves comparativamente a aquelas obtidas de normoglicêmicas e com diabetes gestacional e clínica. Em geral, placentas de gestantes com hiperglicemia leve apresentaram reatividade bastante expressiva aos anticorpos contra VEGF e VEGFR2 em diferentes tipos celulares, o que incluiu células endoteliais vasculares. A imunolocalização de VEGFR1 foi discreta e limitada ao trofoblasto. O padrão de reatividade aos anticorpos nas placentas do grupo diabetes clínica foi semelhante ao observado no grupo normoglicêmico. No grupo diabetes gestacional a reatividade ao VEGF e VEGFR-2 foi bastante discreta e presente apenas no trofoblasto; ao contrário, a reação para VEGFR-1 foi intensa nas células vasculares e trofoblásticas. As presenças destas proteínas foram confirmadas por *Western blot* que também localizou uma banda adicional de 75 kD pelo anticorpo anti-VEGF-R1 compatível com a isoforma solúvel deste receptor nos grupos normoglicemia, diabetes clínica e gestacional. No compartimento decidual as células citotrofoblásticas extravilosas foram sempre reativas a todos os anticorpos. Análise morfológica também mostrou que nos vilos intermediários a deposição de colágeno ao redor dos vasos de maior calibre e dentre eles principalmente os arteriais é atípica em todos os grupos com distúrbio glicêmico em

relação ao normoglicêmico, sendo aparentemente o mais afetado o de diabetes gestacional. Estes achados sugerem uma resposta à condição glicêmica, o que deve ser considerado como um alerta, principalmente por que alterações estão ocorrendo na face fetal da placenta. Em conjunto estes resultados sugerem que o balanço VEGF/VEGF-Rs está alterado nas placentas de gestantes com hiperglicemia leve, o que parece favorecer uma sinalização angiogênica–positiva específica nos territórios placentários e explicar a hipercapilarização induzida nos vilos terminais neste distúrbio glicêmico.

Palavras-chave: placenta; hiperglicemia; VEGF; VEGF-R1; VEGF-R2; angiogênese.

ABSTRACT

PIETRO, L. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) in placentas of hyperglycemia-associated pregnancy.** 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Histologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Hyperglycemia dysfunctions may include different conditions such as overt diabetes, gestational diabetes and also mild hyperglycemia classified according to changes in OGTT and glucose profiles. While diabetes has received considerable attention in the last decades, only few studies have focused on mild hyperglycemia mechanisms and associated disturbs. However, gestational mild hyperglycemia is associated with macrosomia and high risk of perinatal mortality. Morphologically, the placenta of these women is characterized by a relevant increase in the number of terminal villi and capillaries, which has been attributed to a compensatory condition for maintenance of homeostasis at maternal-fetal interface. This study analyzes the participation of VEGF and receptors (VEGFRs) 1 (Flt-1) and 2 (KDR) in placentas from women diagnosed as mild hyperglycemic comparatively to those obtained from normoglycemic and, from gestational and overt diabetes. In general, in the mild hyperglycemic group an expressive immune reaction for VEGF and VEGF-R2 in vascular and trophoblast cells was seen. For VEGF-R1 the immunolocalization was discreet and limited to trophoblast. The pattern of VEGF and receptors reactivity in placentas of overt diabetes was similar to those observed in the normoglycemic group. In gestational diabetes group reaction for VEGF and VEGF-R2 was seen only at the trophoblast; on contrary, the reaction for VEGF-R1 was intense in the vascular and trophoblast cells.

The expression of these proteins were also confirmed by Western blotting, by which an additional band of 75 kD was identified; the recognition of this band by the antibody against VEGF-R1 suggest the presence of VEGF-R1 soluble isoform chiefly in the groups normoglycemic and, gestational and overt diabetes. In the decidual compartment only extravillous trophoblast has reacted to all antibodies. Morphological analysis also showed that collagen deposition occurs around large and arterial vessels in all groups with glycemic disturb, being apparently the most affected the gestational diabetes group. These findings indicate a placental response to the glycemia, what should be carefully considered, once they are occurring at the fetal placenta. Altogether these results also suggest that the balancing VEGF/VEGF-Rs is altered in mild hyperglycemic

placentas, which seems to favor an angiogenic specific signaling at placental territories and to explain the induced-villous hypercapillarization in this gestational disturb.

Key-words: placenta, hyperglycemia, VEGF, VEGF-R1; VEGF-R2, angiogenesis

INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão altamente vascularizado apresentando um rápido crescimento em um curto espaço de tempo, tendo o papel de suprir o aumento da demanda metabólica necessário para o crescimento fetal. Isto se deve em grande parte ao desenvolvimento de uma rede vascular útero-placentária, com plasticidade e eficiência para permitir as modificações necessárias ao longo da gestação (FANT *et al.*, 1992; CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004). Neste contexto, fatores envolvidos no processo de formação destes vasos desempenham um papel de destaque no processo de placentação e sobrevivência fetal.

A formação dos primeiros vasos sanguíneos a partir da diferenciação *in situ* de angioblastos é chamada vasculogênese (RISAU *et al.*, 1991). A partir destes vasos pré-existentes, por um processo denominado angiogênese, novos capilares são formados por brotamento, resultando em um plexo vascular alongado, altamente ramificado (PARDANAUD *et al.*, 1987; RISAU e LEMOM, 1988; BREIER, 2000; JANOTA *et al.*, 2003; CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004). Uma plethora de diferentes proteínas, incluindo moléculas de adesão, componentes da matriz extracelular, fatores de transcrição, fatores de crescimento angiogênicos e seus receptores orquestram a diferenciação e o crescimento dos vasos sanguíneos em ambos os processos (RISAU, 1997).

Estudos referentes ao desenvolvimento, migração e proliferação das células endoteliais realizados em processos patológicos, tais como angiogênese induzida por tumores, têm resultado na identificação, caracterização e purificação de numerosos fatores de crescimento para estas células. O controle do crescimento vascular e sua diferenciação posteriormente é um complexo sistema de atividades e interações entre moduladores positivos e negativos destes processos (BREIER, 2000).

Dentre as muitas famílias de fatores de crescimento envolvidas com a angiogênese, destacam-se as ações do fator de crescimento de endotélio, VEGF, considerado o mais efetivo na indução da proliferação endotelial vascular *in vitro* e angiogênese *in vivo* (FERRARA, *et al.*, 2003; BYRNE, *et al.*, 2005). O VEGF ou VEGF A pertence a uma família de vários fatores de crescimento (VEGF-A, -B, -C, -D e -E) com uma variedade de efeitos sobre a célula endotelial que determinam proliferação, migração, sobrevivência e formação em tubo dos vasos e cuja via de

sinalização é mediada principalmente pelos receptores VEGF-R1 e VEGF-R2 (LIEKENS *et al.*, 2001; MARNEROS e OLSEN, 2001; SOTILLE, 2004).

Diferentes abordagens metodológicas têm mostrado que a ligação do VEGF com seu receptor R2 resulta em formação capilar, enquanto que a ligação VEGF-VEGF-R1 parece desencadear respostas associadas à supressão angiogênica (CAO *et al.*, 1996). Uma forma solúvel do receptor 1 foi descrita recentemente, capaz de competir com o receptor de membrana pela interação com o VEGF secretado e desta forma, funcionar também como agente de regulação negativa da atividade angiogênica mediada pelo VEGF (GU *et al.*, 2008; CUDMORE *et al.*, 2008).

Neste sentido, são muitas as evidências experimentais que mostram que a indução da angiogênese ou sua supressão é o resultado de um balanço fino entre fatores de indução e de supressão deste processo, representados por fatores diversos produzidos por diferentes compartimentos celulares.

Embora angiogênese ocorra de modo generalizado na embriogênese e organogênese, no adulto, o compartimento vascular é relativamente estável, com células endoteliais de baixa atividade mitótica. Este processo está presente, entretanto em condições específicas tais como na reparação do endométrio pós-menstrual (FERREL, 1989; REYNOLDS *et al.*, 1992; NORRBY, 1997; CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004) na formação do corpo lúteo (FERREL, 1989) e na placentação (CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004) ou em condições patológicas, como por exemplo, no reparo de lesões e fraturas (HUDLICKA, 1984; FOLKMANN e KLAGSBRUN, 1987; KLAGSBRUN e D'AMORE, 1991) associado ao crescimento de tumores, fibroses, retinopatias e artrites reumatóides (HUDLICKA, 1984; FOLKMAN e KLAGSBRUN, 1987; BERANEK, 1988; CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004).

Durante o desenvolvimento placentário em humanos, os vilos coriônicos crescem continuamente, associados a uma vasta rede capilar responsável pelas trocas gasosas e metabólicas que vão garantir a sobrevivência do feto no organismo materno. Estes vasos formam-se inicialmente, a partir da fusão do mesoderma alantoideano ao cório por vasculogênese (diferenciação *in situ* de células endoteliais e angioblastos, RISAU e LEMON, 1988; RISAU, 1991) e também por angiogênese (brotamento de capilares a partir de vasos pré-existentes, RISAU, 1995), gerando um plexo vascular altamente ramificado. Este processo que se continua até o fim da gestação é mediado por fatores de crescimento e dentre eles principalmente o VEGF e seus receptores (LIEKENS *et al.*, 2001; JANOTA *et al.*, 2003).

Desordens vasculares podem modificar a função placentária durante as diferentes fases da gestação, o que como consequência, pode prejudicar o desenvolvimento fetal. As disfunções hiperglicêmicas como a diabetes clínica e diabetes gestacional pertencem à classe de patologias que podem alterar a função vascular.

Particularmente no diabetes, caracterizada pelas alterações glicêmicas (teste de tolerância oral à glicose alterado) associadas à falta de insulina ou ao aumento da resistência à insulina, alterações vasculares típicas incluem aterosclerose, angiopatia, edema, neuropatia e endoarterite nos vasos periféricos (RUDGE *et al.*, 1999; ESPER *et al.*, 2008). Estas alterações também podem ser encontradas na decídua basal (CALDERON *et al.*, 2007).

Ao contrário do diabetes, que tem recebido considerável atenção nas últimas décadas, poucos estudos têm focado os mecanismos e distúrbios associados à hiperglicemia leve. Esta alteração funcional caracteriza-se pela modificação do perfil glicêmico sem, entretanto, alterar os valores de normalidade do teste de tolerância à glicose. Estudos sistemáticos têm mostrado que fetos de gestantes com quadro de hiperglicemia leve apresentam altos índices de macrosomia e relevante mortalidade perinatal (RUDGE *et al.*, 2005).

Calderon e colaboradores (2007), por outro lado em um estudo morfométrico detectaram alterações significativas nas placentas destas gestantes representadas pelo aumento no número de vilos terminais e aumento também da área total e do número dos vasos destes vilos. Estes estudos sugerem um crescimento vascular de regiões vilosas terminais e, portanto, relacionadas a processos de trocas gasosas e metabólicas o que foi interpretado como um mecanismo compensatório para aumentar o aporte de oxigênio fetal. De modo geral nos quadros hiperglicêmicos, a exposição da hemoglobina a concentrações elevadas de glicose no sangue leva à formação de hemoglobina glicosilada (WATALA *et al.*, 1996). Esta condição interfere no transporte de oxigênio e pode causar hipóxia tecidual, desencadeando micro e macroangiopatia (IINO *et al.*, 1996). Esta pode ser uma explicação para a resposta vascular observada na placenta destas gestantes.

Neste contexto, em uma parceria com unidades clínicas (Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Paulista do Estado de São Paulo e Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo) que pretendem caracterizar a ocorrência da hiperglicemia gestacional leve para fins diagnósticos, prognósticos, terapêuticos e preventivos, este trabalho pretendeu acrescentar informações sobre este

distúrbio glicêmico determinando a expressão de VEGF e seus receptores, VEGF-R1 e VEGF-R2, na placenta a termo, comparando estes resultados com os encontrados em gestantes não-diabéticas e portadoras de diabete gestacional e clínica.

CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitiram concluir que nos vilos das gestantes hiperglicêmicas leves:

- (i) Coexistem células produtoras de VEGF nos diferentes compartimentos vasculares, mas que não é a expressão deste fator decrescimento e sim a via de sinalização que utiliza que pode estar associada às respostas angiogênicas encontradas;
- (ii) Baseado na imunolocalização de VEGF-R1, apenas no trofoblasto e do VEGF-R2 nas células endoteliais dos vasos vilosos (células-alvo para a angiogênese), a resposta mediada pelo VEGF, parece ocorrer via VEGF-R2 e não via VEGF-R1, que é consistentemente uma ligação que regula negativamente a angiogênese;
- (iii) A localização de uma banda de ~ 75 kD compatível com a forma solúvel de VEGF-R1, reguladora negativa da atividade angiogênica, precisa ser futuramente melhor determinada uma vez que esta diminuída no grupo hiperglicemia leve e pode ter um significado funcional importante no controle da angiogênese.
- (iv) O balanço geral do VEGF e seus receptores nos vilos das gestantes hiperglicêmicas parece favorecer uma sinalização angiogênica-positiva específica nos territórios placentários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Gestational diabetes mellitus (Position Statement). **Diabetes Care**, v. 21, p. S60–S61, 1998. Suppl. 1.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Clinical practice recommendations. **Diabetes Care**, v. 28, p S-1-79, 2005. Suppl 1.

ATHANASSIADES, A.; HAMILTON, G.S.; LALA, P.K. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 643-654, 1998.

BABAWALE, M.O.; LOVAT, S.; MAYHEW, T.M.; LAMMIMAN, M.J.; JAMES, D.K.; LEACH, L. Effects of gestational diabetes on junctional adhesion molecules in human term placental vasculature. **Diabetologia**, v. 43, p.1185-1196, 2000.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P. Architecture of normal villous tree. In: **Pathology Human Placenta**. 4th ed. New York: Springer-Verlag; 2000.

BENJAMIN, L.E. Glucose, VEGF-A, e Diabetic Complications. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 1181-1184, 2001.

BERANEK, J.T. Antiangiogenesis comes out of its shell. **Cancer J.**, v. 2, p. 87-88, 1988.

BRADFORD, L.W. Problems of ethics and behavior in the forensic sciences. **J. Forensic. Sci.**, v. 21, p. 763-8, 1976.

BREIER, G. Angiogenesis in embryonic development – a review. **Placenta**, v. 21, p. S11-S15, 2000. Suppl 1.

BROWLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 13, p. 813-820, 2001.

BUTLER, A.E.; JANG, J.; GURLO, T.; CARTY, M.D.; SOELLER, W.C.; BUTLER, P.C. Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 1509-1516, 2004.

BYRNE, A.N.; BOUCHIER HAYES, D.J.; HARMEY, J.H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J. Cell. Med.**, v. 9, p. 777-794, 2005.

CALDERON, I.M.P. **Estudo morfométrico de vilosidade placentária relacionado a níveis glicêmicos e dopplervelocimetria da artéria umbilical em gestações**

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

complicadas por hiperglicemia diária ou diabetes gestacional ou clínico. Dissertação (Tese de livre-docência) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2003.

CALDERON, I.M.P.; DAMASCENO, D.C.; AMORIN, R.L.; COSTA, R.A.A.; BASIL, M.A.M.; RUDGE, M.V.C. Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. **Diab. Res. Clin. Pract.**, v. 78, p. 65-71, 2007.

CANIGGIA, I.; MOSTACHFI, H.; WINTER, J.; GASSMANN, M.; LYE, S.J.; KULISZEWSKI, M.; POST, M. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF β 3. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p.577-587, 2000.

CAO, Y.; LINDEN, P.; SHIMA, D.; BROWNE, F.; FLOKAMN, J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p.2507-11, 1996.

CHADDHA, V.; VIERO, S.; HUPPERTZ, B.; KINGDOM, J. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. **Semin. Fetal Neon. Med.**, v. 9, p. 357-369, 2004.

CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular Regulation. **Placenta**, v. 25, p. 103-113, 2004.

CHEN, C.P.; CHANG, S.C.; VIVIAN YANG, W.C. High glucose alters proteoglycan expression and the glycosaminoglycan composition in placentas of women with gestational diabetes mellitus and in cultured trophoblasts. **Placenta**, v. 28, p. 97-106, 2007.

CLARK, D.E.; SMITH, S.K.; SHARKEY, A.M.; CHARNOK-JONES, D.S. Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. **Hum. Reprod.**, v. 11, p. 1090-1098, 1996.

COOPER, J.C.; SHARKEY, A.M.; McLAREN, J.; CHARNOK-JONES, D.S.; SMITH, S.K. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. **J. Reprod. Fert.**, v. 105, p. 205-213, 1995.

CUDMORE, M.; AHMAD, S.; AI-ANI, B.; FUJISAWA, T.; COXALL, H.; CHUDASAMA, K.; DEVEY, L.R.; WIGMORE, S.J.; ABBAS, A.; HEWETT, P.W.; AHMED, A. Negative regulation on soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. **J. Am. Heart Assoc.**, p. 1787-1797, 2008.

DEL NERO, U.; RUDGE, M.V.C.; NOVO, N.F.; CLADERON, I.M.P.; BRASIL, M.A.M. Metodologia para estudo do volume e densidade absoluta da placenta humana a termo. **Rev. Bras. Ginec. Obst.**, v. 24, p. 669-673, 2002.

DEMIR, R.; KAYISLI, U.A.; SEVAL, Y.; CELIK-OZENCI, C.; KORGUN, E.T.; DEMIR-WEUSTERN, A.Y. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. **Placenta**, v. 25, p. 560-572, 2004.

DEMIR, R.; KAYISLI, U.A.; CAYLI, S.; HUPPERTZ, B. Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. **Placenta**, v. 27, p. 535-539, 2006.

DE VRIESE, A.S.; TILTON, R.G.; STEPHAN, C.C.; LAMEIRE, N.H. Vascular endothelial growth factor is essential for hyperglycemia-induced structural and functional alterations of the peritoneal membrane. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 12, p. 1734-1741, 2001.

ESPER, R.J.; VILARIÑO, J.O.; MACHADO, R.A.; PARAGANO, A. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. **Adv. Cardiol.**, v. 45, p. 17-43, 2008.

FANT, M.E.; NANU, L.; WORD, R.A. A potential role for endothelin-1 in human placental growth: Interaction with the insulin-like growth factor family of peptides. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 74, p. 1158-1163, 1992.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr. Rev.**, v. 18, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med.**, v. 9, p. 669-676, 2003.

FERREL, C.L. Placental regulation of fetal growth. In: **ANIMAL growth regulation**. New York: Plenum, 1989. p. 1-19.

FISHMAN, A.P. (Ed.). Endothelium. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 401, p. 1-9, 1982.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 253, p. 442-447, 1987.

GERALD, D.; BERRA, E.; FRAPART, Y.M. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. **Cell**, v. 118, p. 781-794. 2004.

GERBER, H.P.; VU, T.H.; RYAN, A.M.; KOWALSKI, J.; WERB, Z.; FERRARA, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nat. Med.**, v. 5, p. 623-628, 1999.

GERETTI, E.; SHIMIZU, A.; KLAGSBRUM, M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, p. 31-39, 2008.

GU, Y.; LEWIS, D.F.; WANG, Y. Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in

normal and preeclamptic pregnancies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, p. 260-266, 2008.

HADI, H.A.; SUWAIDI, J.A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Vasc. Health Risk Mang.**, v. 3, p. 853-76, 2007.

HARRIS, L.K.; APLIN, J.D. Vascular Remodeling and Extracellular Matrix Breakdown in the Uterine Spiral Arteries During Pregnancy. **Reprod. Sci.**, v. 14, p. 28-34, 2007.

HATTORI, Y.; NERUSU, K.C.; BHAGAVATHULA, N.; BRENNAN, M.; HATTORI, N.; MURPHY, H.S.; SU, L.D.; WANG, T.S.; JOHNSON, T.M.; VARANI, J. Vascular expression of matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) in basal cell carcinoma. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 74, p. 230-7, 2003.

HELSKE, S.; VUORELA, P.; CARPÉN, O.; HORNIG, C.; WEICH, H.; HALMESMAKI, E. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 2, p. 205-210, 2001.

HICKLIN, D.; ELLIS, L.M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 1011- 1027, 2005.

HUDLICKA, O. Development of microcirculation: capillary growth and adaptation. In: **HANDBOOK of Physiology**. Washington: American Physiological Society Press, 1984. p. 165-216.

HULL, R.L.; WESTERMARK, G.T.; WESTERMARK, P.; KAHN, S.E. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 3629-3643, 2004.

HUPPERTZ, B.; TEWS, D.S.; KAUFFMAN, P. Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. **Int. Rev. Cytol.**, v. 205, p. 215-253, 2001.

IINO, K.; YOSHINARI, M.; DOI, Y.; SHINOHARA, N.; IWASE, M.; FUJISHIMA, M. Reduced tissue oxygenation and its reversibility by glycemic control in diabetic patients. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 34, p. 163-168, 1997.

JAMES, J.L.; STONE, P.R.; CHAMLEY, L.W. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. **Hum. Reprod. Update**, v. 12, p. 137-144, 2006.

JANOTA, J.; POMYJE, J.; TOOTH, D.; SOSNA, O.; ZIVNY, J.; KUZEL, D.; STRANAK, Z.; NECAS, E.; ZIVNY, J.H. Expression of angiopoietic factors in normal and type-I diabetes human placenta: a pilot study. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 111, p. 153-156, 2003.

JANSSON, T.; EKSTRAND, Y.; BJORN, C.; WENNERGREN, M.; POWELL, T. Alterations in the activity of placental amino acid transporters in pregnancies complicated by diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 2214-2219, 2004.

JIN, S.M.; NOH, C.I.; YANG S.W.; BAE E.J.; SHIN, C.H.; CHUNG, H.R.; KIM Y.Y.; YUN, Y.S. Endothelial dysfunction and microvascular complications in type 1 diabetes mellitus. **J. Korean Med. Sci.**, v. 23, p. 77-82, 2008.

JIRKOVSKA, M.; KUBINOVA, L. JANCEK, J.; MORAVCOVA, M.; KREJCI, V.; KAREN, P. Topological properties and spiral organization of villous capillaries in normal and diabetic placentas. **J. Vasc. Res.**, v. 39, p. 268-278, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v. 11, p. 447-55, 1979.

KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M.; CHARNOCK-JONES, D.S. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. **Placenta**, v. 25, p. 114-126, 2004.

KANNO, S.; ODA, N.; ABE, M.; TERAJ, Y.; ITO, M.; SHITARA, K.; TABAYASHI, K.; SHIBUYA, M.; SATO, Y. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. **Oncogene**, v. 19, p. 2138-2146, 2000.

KERCHE, L.T.R.L.; ABBADE, J.F.; ARAÚJO COSTA, R.A.; RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P. Fatores de risco para macrosomia fetal em gestações complicadas por diabete ou por hiperglicemia diária. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 27, p. 580-587, 2005.

KHAN, Z.A.; CHAKRABARTI, S. Cellular signaling and potential new treatment targets in diabetic retinopathy. **Exp. Diabetes Res.**, 2007:31867, 2007. Review

KINGDOM, J.; HUPPERTZ, B.; SEAWARD, G.; KAUFMANN, P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. **Eur. J. Obstet. Gynecol.**, v. 92, p. 35-43, 2000.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P.D. Regulators of angiogenesis. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 53, p. 217-239, 1991.

KLIP, A.; MARETTE, A.; DIMITRAKOU DIS, D.; RAMLAL, T.; GIACCA, A.; SHI, Z.Q.; VRANIC, M. Effect of diabetes on glucoregulation. From glucose transporters to glucose metabolism in vivo. **Diabetes Care**, v. 15, p. 1747-1766, 1992.

KUMAZAKI, K.; NAKAYAMA, M.; SUORIYUKI, N.; WADA, Y. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. **Human Pathol.**, v. 33, p. 1069-1076, 2002.

LASH, G.; MACPHERSON, A.; LIU, D.; SMITH D.; CHARNOCK-JONES, S. BAKER, P. Abnormal fetal growth is not associated with altered chorionic villous expression of vascular endothelial growth factor mRNA. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 7, p. 1093-8, 2001.

LASH, G.E.; TAYLOR, C.M.; TREW, A.J.; COOPER, S.; ANTHONY, F.W.; WHEELER, T.; BAKER, P.N. Vascular endothelial growth factor and placental growth factor release in cultured trophoblast cells under different oxygen tensions. **Growth Factors**, v, 20, p. 189-96, 2002.

LANDO, D.; PEET, D.J., WHELAN, D.A.; GORMAN, J.J. WHITELAW, M.L. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. **Science**, v. 295, p. 858-861, 2004.

LEUNG, D.W.; CACHIANES, G.; KUANG, W.J.; GOEDDEL, D.V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, 1989 Dec 8;246(4935):1306-9

LIEKENS, S.; CLERCQ, E.D.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, p. 253-270, 2001.

LIMA, C.P. **A placenta da gestante diabética**. 133 f. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 1998.

LYALL, F.; BULMER, J.N.; DUFFIE, E.; COUSINS, F.; THERIAULT, A.; ROBSON, S.C. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation; the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 1713-1721, 2001.

MAYHEW, T.M. Enhanced fetoplacental angiogenesis in pré-gestacional diabetes mellitus: the extra growth is exclusively longitudinal and not accompanied by microvascular remodeling. **Diabetologia**, v. 45, p. 1434-1439, 2002.

MAYHEW, T.M.; CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis III. Changes in complicated pregnancies. **Placenta**, v. 25, p. 127-139, 2004.

MARNEROS, A.G.; OLSEN, B.R. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. **Matrix Biol.**, v. 20, p. 337-345, 2001.

MELOAN, S.N.; PUCHTLER, H. Demonstration of amyloid with Mesitol WLS-Congo Red: application of a textile auxiliary to histochemistry. **Histochemistry**, v. 58, p. 163-166, 1978.

MUNAUT, C.; LORQUET, S.; PEQUEUX, C.; BLACHER, S.; BERNDT, S.; FRANKENNE, F.; FOIDART, J.M. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. **Hum. Reprod.**, p. 1-9, 2008.

NAGY, J.A.; DYORAK, A.M.; DYORAK, H.F. VEGF-A and the Induction of Pathological Angiogenesis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 2, p. 251-275, 2007.

NERLICH A.G.; SCHLEICHER, E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. **Am. J. Pathol.**, v. 139, p. 889-99, 1991.

NORRBY, K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. **APMIS**, v. 105, p. 417-437, 1997.

OTROCK, Z.K.; MAKAREM, J.A.; SHAMSEDDLINE, A.I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 38, p. 258-268, 2007.

PARDNAUD, L.C. ALTMANN, C. KITOS, D.F.; BUCK, C.A. Vasculogenesis in early quail as studied with a monoclonal antibody endothelial cells. **Development**, v. 100, p. 339-347, 1987.

REYNOLDS, L.P.; KILLILEA, S.D.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive system. **FASEB J.**, v. 6, p. 886-892, 1992.

RISAU, W. Differentiation of endothelium. **FASEB J.**, v. 9, p. 926-933, 1995.

RISAU, W. Vasculogenesis and angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. In: FEINBERG, R. N.; SHERER, G.K.; AUERBACK, R. (Ed.). **Development vascular system**. Karger, Basel: Press, 1991. p. 58-68.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 17, p. 386-671, 1997. Review.

ROY, S.; MAIELLO, M.; LORENZI, M. Increased expression of basement membrane collagen in human diabetic retinopathy. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 438-42, 1994.

RUDGE, M.V.C. **Perfil glicêmico e teste de tolerância oral à glicose (GGT) no diagnóstico do diabetes na gestação**. 83 f. Dissertação (Livre-docência) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1983.

RUDGE, M.V.; CALDERON, I.M.; RAMOS, M.D.; PERAÇOLI, J.C.; PIM, A. Hypertensive disorders in pregnant women with diabetes mellitus. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 44, p. 11-15, 1997.

RUDGE, M.V.C.; GOMES, C.M.M.; CALDERON, I.M.O.; RAMOS, M.D.; ABBADE, J.F.; OLIVEIRA, M.G.M.; SILVA, M.G. Study of the evolution of the placenta and fetal pâncreas in the pathophysiology of growth retardation intra uterine due to restricted maternal diet. **Rev. Paul. Med.**, v. 2, p. 29-56, 1999.

RUDGE, M.V.; CALDERON, I.M.; RAMOS, M.D.; ABBADE, J.F.; RUGOLO, L.M. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. A retrospective 10-year analysis. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 50, p. 108-112, 2000.

RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P.; RAMOS, M.D.; BRASIL, M.A.P.; RUGOLO, L.M.S.S.; BOSSOLAN, G.; ODLAND, J.O. Hiperglicemia materno diária diagnosticada pelo perfil glicêmico: um problema de saúde pública materno perinatal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 27, p. 691-697, 2005.

SADLER, T.W. Langman's Embriologia Médica. In: SADLER, T.W.; ALMEIDA, J.M.; MUNDIN, F.D. (Ed.). **Primeira semana de gestação: da Oocitação à Implantação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 21-33.

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**, v. 97, p. 785-91, 2001.

SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M.; PERRUZZI, C.A.; HARVEY, V.S.; DVORAK, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, p. 983-985, 1983

SHARKEY, A.M.; CHARNOCK-JONES, D.S.; BOOCOOCK, C.A.; BROWN, K.D.; SMITH, S.K. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 609-615, 1993.

SHEPHERD, F.A.; SRIDHAR, S.S. Angiogenesis inhibitions under study for the treatment of lung cancer. **Lung Cancer**, v. 41, 2003. Suppl 1, p. S63-72. Review.

SHERER, D.M.; ABULAFIA, O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. **Placenta**, v. 22, p. 1-13, 2001.

SHIBUYA, M.; YAMAGUCHI, S.; YAMANE, A. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. **Oncogene**, v. 5, p. 519-524, 1990.

SHIBUYA, M.; CLAESSEON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiosis. **Exp. Cell Res.**, v. 312, p. 549-560, 2006.

SHWEIKI, D.; NEEMAN, M.; ITIN, A. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and glucose deficiency in multicell spheroids: implications of tumor angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 768-772, 1995.

SOTTILE, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 4, p. 13-22, 2004.

TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, S.; CHIDA, K.; SHIBUYA, M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. **EMBO J.**, v. 20, p. 2768-2778, 2001.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin. Sci.**, v. 109, p. 227-241, 2005.

TASKINEN, M.R. Criteria for metabolic control and intervention in diabetes. **Diabetes**, v. 45, p. S120-S122, 1996. Suppl 3.

TERMAN, B.I.; CARRION, M.E.; KOVACS, E.; RASMUSSEN, B.A. EDDY, R.L.; SHOWS, T.B. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. **Oncogene**, v. 6, p. 1677-1683, 1991.

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.**, v. 188, p. 517-23, 2003.

VEIKKOLA, T.; ALITALO, K. VEGFs, receptors and angiogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 9, p. 211-220, 1999.

VLISSARA, H.; BROWNLEE, M.; CERAMI, A. Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation endproducts. **J. Exp. Med.** v. 160, p. 197-207, 1984.

VRANES, D.; COOPER, M.E.; DILLEY, R.J. Cellular mechanisms of diabetic vascular hypertrophy. **Microvasc. Res.**, v. 57, p. 8-18, 1999.

VUCKOVIC, M.; PONTING, J.; TERMAN, B.I.; NIKETIC, V.; SEIF, M.W.; KUMAR, S. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta. **J. Anat.**, v. 188, p. 361-366, 1996.

VUORELA P.; HALMESMAKI E. Vascular endothelial growth factor, its receptors, and the tie receptors in the placental bed women with preeclampsia, diabetes, and intrauterine growth retardation. **Am. J. Perinatol.**, v. 23, p. 255-263, 2006.

WATALA, C.; GOLAHSKI, J.; WITAS, H.; GURBIEL, R.; GWOiDZIFIISKI, K.; TROJANOWSKI, Z. The Effects of in viva and in vitro Non-enzymatic Glycosylation and Glycooxidation on Physico-chemical Properties of Haemoglobin in Control and Diabetic Patients. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.28, p.1343-1403, 1996.

WATANABE, Y.; TATSUMIYA, T.; TANAKA, M.; YAMADA, H.; SAHASHI, T. : Clinico-pathological studies on fibrinoid deposit of human placenta. **Acta Obstet. Gynecol. Jpn**, v. 19, p. 214-215, 1972.

WOOLARD, J.; WANG, W.Y., BEVAN, H.S. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, *in vivo* effect on angiogenesis and endogenous protein expression. **Cancer Res.**, v. 64, p. 7822-7835, 2004.

WU, Y.; SALDANA, L.; CHILLAR, R.; VADGAMA, J.V. Plasma vascular endothelial growth factor is useful in assessing progression of breast cancer post surgery and during adjuvant treatment. **Int. J. Oncol.**, v. 20, p. 509-16, 2002.

YABE-NISHIMURA, C. Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 6, p. 1509-1516, 2004.

YANAGISAWA, M.; HURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; KATSUTOSHI, G.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, p. 411-415, 1988.

ZHOU, Y.; MCMASTER, M.; WOO, K.; JANATPOUR, M.; PERRY.; KARPANEN, K.; DAMSKY; FISHETR, S. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. **Am. J. Pathol.**, v. 4, p. 1405-1423, 2002.