



Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde  
**Doutorado**



# **LIPIDÔMICA E PRÉ ECLÂMPSIA**

**LORENA LAUREN CHAVES QUEIROZ**

São Luís/MA  
2019

**LORENA LAUREN CHAVES QUEIROZ**

**LIPIDÔMICA E PRÉ ECLÂMPSIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão – UFMA como requisito para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof.º Dr.º José Albuquerque de Figueiredo Neto

São Luís/MA  
2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

QUEIROZ, LORENA LAUREN CHAVES.  
LIPIDOMICA E PRE ECLAMPSIA / LORENA LAUREN CHAVES  
QUEIROZ. - 2019.  
96 f.

Orientador(a): Jose Albuquerque de Figueiredo Neto.  
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
SAO LUIS, 2019.

1. Acilcarnitinas. 2. Esfingomielinas. 3. Lipidômica  
Acilcarnitinas, Esfingomielinas. Lisosfosfatidilcolinas.  
4. Lisosfosfatidilcolinas. 5. Pre eclampsia. I.  
Figueiredo Neto, Jose Albuquerque de. II. Título.

# LORENA LAUREN CHAVES QUEIROZ

## LIPIDÔMICA E PRE ECLAMPSIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências da Saúde.

A comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Doutorado em Ciências da Saúde, em sessão pública realizada no dia 25 de Janeiro de 2019, considerou a candidata

( ) **APROVADA**

( ) **REPROVADA**

---

Orientador: Prof.º Dr.º Jose Albuquerque de Figueiredo Neto  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Drª. Sally Cristina Moutinho Monteiro  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Drª. Luciane Maria Oliveira Brito  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Drª. Rosane Nassar Meireles Guerra Liberio  
Universidade Federal do Maranhão

---

Drª. Rosângela Maria Lopes de Sousa  
Universidade CEUMA

Suplentes:

---

Prof. Dr.º Vinicius Jose da Silva Nina  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Drº. Silvio Gomes Monteiro  
Universidade CEUMA

## DEDICATÓRIA

*A Deus por seu amor e cuidado, conhecedor do que os outros nem imaginam...*

*Dedico este trabalho, a minha família, em especial meus filhos: **Arthur**, que era muito pequeno quando iniciei e ao **Augusto**, que chegou no decorrer do curso. Vocês são a razão de tudo acontecer. Luz da minha vida!*

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*(Marthin Luther King)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a DEUS, que tudo criou, e ao longo de minha vida concedeu a sustentação necessária a essa jornada de profissionalização e aquisição de conhecimentos.

Ao meu esposo *Marcio Lee de Meneses Bezerra*, companheiro, capaz de suportar o convívio ao meu lado, de lamentar na minha tristeza, vibrar com a minha alegria. Eu te amo!

Aos meus filhos *Arthur e Augusto*, pois são pessoas especiais que a vida colocou em meu caminho. Amo vocês!

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que me proporcionou a oportunidade de cursar este doutorado.

Aos meus amigos e colegas do curso de doutorado, que durante esses anos compartilharam os desafios e as alegrias.

À Universidade Estadual do Maranhão, campus Santa Inês, pela compreensão e flexibilidade que me concedeu em prosseguir os estudos e a docência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. *Jose Albuquerque de Figueiredo Neto*, Meus sinceros agradecimentos por sua ajuda e disponibilidade, orientação e apoio. Agradeço profundamente ter continuado a acreditar.

Aos professores, que desde o início do Curso de doutorado, contribuíram enfaticamente com a minha formação. Devo a vocês respeito e agradecimento por terem ido muito além dos livros e teorias.

**LISTA DE SIGLAS**

<b>ADAM -12</b>	Desintegrina e Metaloproteinase Domínio 12
<b>AG</b>	Ácidos Graxos
<b>BH</b>	Benjamini-Hochberg
<b>ChoE</b>	Ésteres de colesterol
<b>CIUR</b>	Crescimento Intra uterino Retardado
<b>CIVD</b>	Coagulação Intravascular Disseminada
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>DG</b>	Diacilglicerol
<b>DHEG</b>	Doença Hipertensiva Especifica da Gestação
<b>DM2</b>	Diabetes Melittus tipo 2
<b>DNA</b>	Ácido Desoxiribonucléico
<b>DOPA</b>	Dopamina
<b>FC</b>	Fold change
<b>HA</b>	Hipertensão Arterial
<b>HAC</b>	Hipertensão Arterial Crônica
<b>HbA1C</b>	Hemoglobina glicada
<b>HCG</b>	Hormônio Gonadotrofina Coriônica
<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoproteins</i>
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitário humano
<b>HLP</b>	Hormônio Lactogênico Placentário
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporea
<b>ISSHP</b>	Internacional Society for the Study of Hypertension in Pregnancy
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoproteins</i>
<b>LPC</b>	Lisofosfolina
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercúrio
<b>NHBPEP</b>	National High Blood Pressure Education Program



<b>NHBPEPWG</b>	High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy
<b>NTG</b>	Neoplasia Trofoblástica Gestacional
<b>PAD</b>	Pressão Arterial Diastólica
<b>PAPP-2</b>	Proteína Plasmática A Associada à Gravidez 2
<b>PAPP-A</b>	Papalisina
<b>PAS</b>	Pressão Arterial Sistólica
<b>PC</b>	Fosfatidilcolinas
<b>PE</b>	Pré - eclâmpsia
<b>PIG</b>	Pequeno para a Idade Gestacional
<b>PIGF</b>	Fator de Crescimento Placentário
<b>PP-13</b>	Proteína placentária 13
<b>PTX3</b>	Pentraxin 3
<b>SBC</b>	Sociedade Brasileira de Cardiologia
<b>sEng</b>	Endogлина solúvel
<b>sFlt-1</b>	Tirosina quinase solúvel
<b>SHEG</b>	Síndromes Hipertensivas na Gravidez
<b>S1P</b>	Esfingosina – 1- fosfato
<b>SPE</b>	Síndrome Pre eclampsia
<b>SPM</b>	Esfingomielinas
<b>TG</b>	Triglicérides
<b>TGFB</b>	Fator Transformador de Crescimento Beta
<b>VEGF</b>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<i>pg</i>
<b>Quadro 1</b> Classificação da síndrome hipertensiva gestacional (NHBPEPWG, 2000).	<b>24</b>
<b>Quadro 2</b> Fatores de risco para síndrome de da Pré-eclâmpsia (PE).	<b>26</b>
<b>Figura 1</b> Adaptação circulatória materno-fetal	<b>28</b>
<b>Figura 2</b> Modelos de estágio da Pré-eclâmpsia (PE).	<b>31</b>
<b>Quadro 3</b> Biomarcadores da Pré-eclâmpsia (PE).	<b>32</b>

## RESUMO

A Pré-Eclâmpsia (PE) é um distúrbio da gravidez potencialmente fatal, cuja patogênese não é completamente entendida. A origem da PE ocorre muito cedo na gravidez, por isso muitos marcadores biofísicos e bioquímicos têm sido propostos como preditores de pré-eclâmpsia. O objetivo deste estudo foi avaliar detalhadamente o perfil lipídico, a fim de identificar possíveis alterações, abrindo uma nova perspectiva para a compreensão dos distúrbios metabólicos vivenciados pelas gestantes com PE, usando uma abordagem lipidômica envolvendo espectrometria de massa. Analisou-se o perfil lipídico sérico em 40 grávidas com pré eclampsia e normais, e não houve diferença entre os dois grupos em relação à idade, estado civil, cor, escolaridade, trabalho ou renda familiar. Ao aplicar uma abordagem lipidômica e espectrometria de massa. Espécies lipídicas do tipo acilcarnitinas (C0, C3 e C5) apresentaram alterações significantes ( $p < 0,05$ ). Observou-se também que as lisofosfatidilcolinas (lysoPC a C20:4 e a lysoPC a C28:1) aparecem inicialmente dentre os metabólitos que apresentaram diferenças estatisticamente significantes, mas após a correção de múltiplos testes aplicando Benjamini-Hochberg (BH) essa significância não se manteve. Porém destaca-se que as lysoPC.a.C 16.1; 18.1; 20:4 e a 28:1 apresentaram concentrações aumentadas no grupos pre eclampsia. Um aumento nos níveis plasmáticos de esfingomielinas C18.0, C18.1, C20.2, C24.1, C26.0 e C26.1 foram observados em pacientes com pré-eclâmpsia. Após análise multivariada e aplicação de BH, os valores foram significativos apenas para os metabólitos SM C18:0, SM C18:1 e SM C26:0. Este estudo detectou alterações lipídicas, especialmente em acilcarnitinas em gestantes com pré-eclâmpsia, bem como correlações com as lisofosfatidilcolinas, além de gestantes com pré-eclâmpsia com elevação de Esfingomielina, o que pode estar associado ao processo de instalação da pré-eclâmpsia. Tais metabólitos podem auxiliar no conhecimento da gênese da pré-eclâmpsia, que poderão no futuro ser úteis na investigação de doenças associadas à pré eclampsia.

**Palavras-chave:** Pré- Eclâmpsia. Lipidômica. Acilcarnitinas. Lisofosfatidilcolinas. Esfingomielinas, Espectrometria de Massa

## ABSTRACT

Pre-Eclampsia (PE) is a potentially fatal pregnancy disorder whose pathogenesis is not fully understood. The origin of PE occurs very early in pregnancy, so many biophysical and biochemical markers have been proposed as predictors of preeclampsia. The objective of this study was to evaluate the lipid profile in detail in order to identify possible alterations, opening a new perspective for the understanding of the metabolic disorders experienced by pregnant women with PE, using a lipidic approach involving mass spectrometry. The serum lipid profile was analyzed in 40 pregnant women with preeclampsia and normal, and there was no difference between the two groups in relation to age, marital status, color, schooling, work or family income. When applying a lipidomic approach and mass spectrometry. Lipid species of the acylcarnitine type (C0, C3 and C5) showed significant changes ( $p < 0.05$ ). Lysophosphatidylcholines (lysoPC to C20: 4 and lysoPC to C28: 1) initially appear among the metabolites that presented statistically significant differences, but after the correction of multiple tests using Benjamini-Hochberg (BH) this significance was not maintained. However, it should be noted that lysoPC.a.C 16.1; 18.1; 20: 4 and 28: 1 showed increased concentrations in the preeclampsia groups. An increase in plasma levels of sphingomyelins C18.0, C18. 1, C20. 2, C24.1, C26.0 and C26.1 were observed in patients with preeclampsia. After multivariate analysis and BH application, the values were significant only for the metabolites SM C18: 0, SM C18: 1 and SM C26: 0. This study detected lipid alterations, especially in acylcarnitines in pregnant women with pre-eclampsia, as well as correlations with lysophosphatidylcholines, in addition to pregnant women with preeclampsia with elevation of Sphingomyelin, which may be associated with the process of pre-eclampsia. Such metabolites may assist in the knowledge of the genesis of preeclampsia, which may in the future be useful in the investigation of diseases associated with preeclampsia. Further studies are needed to confirm this data.

**Keywords:** Pre Eclampsia. Lipidomic. Acylcarnitines. Lysophosphatidylcholines. Sphingomyelins, Mass Spectrometry

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA SEÇÃO</b>	14
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	18
2.1 Definição e classificação das síndromes hipertensivas	18
2.2 A Síndrome Hipertensiva Gestacional	21
2.3 Pre Eclampsia	25
2.3.1 Epidemiologia	25
2.3.2 Fatores de risco	26
2.3.4 Pré eclampsia: o modelo de dois estágios	30
2.3.5 Pre eclampsia: possíveis Biomarcadores	31
2.3.6 Lipídios, lipoproteínas e a gestação	35
2.3.7 Lipidômica	39
<b>3 MÉTODOS</b>	44
3.1 Tipo de estudo	44
3.2 População de estudo	44
3.3 Coleta e armazenamento de amostras	45
3.4 Análise Lipodômica	45
3.5 Análise Estatística	46
3.6 Aspectos Éticos	46
<b>SEGUNDA SEÇÃO</b>	47
<b>4 CAPÍTULO 1</b> – artigo 1 ESFINGOLIPÍDIOS AND THE DEVELOPMENT OF PRE ECLAMPSIA IN GESTANTES DE SÃO LUIS, MARANHAO	48
<b>5 CAPÍTULO 2</b> – artigo 2 AVALIAÇÃO LIPIDÔMICA DO PLASMA DE MULHERES COM E SEM PRÉ-CLÂMPSIA	66
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	96
APÊNDICES	102

## **PRIMEIRA SEÇÃO**

### **1 INTRODUÇÃO**

O enfrentamento da morte materna continua sendo um grande desafio das populações mundiais, em especial, as mais vulneráveis e aquelas dos países em desenvolvimento visto que em sua maioria poderia ser evitada. A morte da mulher durante o ciclo gravídico-puerperal representa um fenômeno não apenas biológico, mas também social e econômico, cujo impacto acarreta prejuízos irreversíveis não apenas do ponto de vista individual, de cada família, mas também de toda uma sociedade (BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015).

No Brasil, com o aprimoramento da qualidade da informação e a valorização dos estudos sobre mortalidade materna, tem sido possível identificar com uma maior efetividade as principais causas de óbito, conhecer os critérios de evitabilidade e correlacioná-los com os determinantes sociais em saúde (CUNHA; CAMPOS; BARBOZA, 2011).

Os índices de mortalidade materna nos países em desenvolvimento são alarmantes. Em 2003, a razão de mortalidade materna no Brasil, obtida a partir de óbitos declarados, foi de 51,7 óbitos maternos por 100.000 nascidos vivos. Além disso, a razão de mortalidade materna corrigida foi de 72,4 por 100.000 nascidos vivos, correspondendo a 1.572 óbitos maternos. Entre as causas diretas, a síndrome hipertensiva específica da gestação (SHEG) (Eclampsia (E)/ Pré –Eclâmpsia (PE) representou a primeira causa de óbito entre todas as categorias de raça/cor consideradas (BRASIL, 2011).

Os distúrbios hipertensivos são as complicações mais comuns no pré-natal, acometendo 12 a 22% das gestações, sendo a eclâmpsia uma das principais causas de óbito materno em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento (MOURA; OLIVEIRA; DAMASCENO; PEREIRA, 2010). As síndromes hipertensivas na gestação (SHG) representam a terceira causa de mortalidade materna no mundo e no Brasil pode-se chegar a 10% dos casos (OLIVEIRA et al, 2016).

As SHG quando conduzidas com um plano terapêutico apropriado podem apresentar melhor prognóstico tanto materno quanto neonatal, porém se essa mulher não for tratada com medidas efetivas e por vezes inadiáveis

possibilitando tomada de decisão e a realização de intervenções em tempo hábil, pode perder-se a oportunidade de possivelmente interceptar a evolução para desfechos como a eclampsia entre outros (BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015).

A prevenção da PE revolucionaria o acompanhamento pré-natal e salvaria muitas vidas de mães e fetos, principalmente em países subdesenvolvidos, nos quais suas consequências são devastadoras. Entretanto, é difícil desenvolver estratégias racionais para a prevenção, uma vez que sua causa não é totalmente conhecida (MOL et al, 2015).

As estratégias de prevenção das Síndromes Hipertensivas, dentre elas PE se mostram desapontadoras, provavelmente, devido ao fato das intervenções propostas serem focadas no início do aparecimento dos sintomas, enquanto os fenômenos de comprometimento vascular já se instalaram bem antes. A prevenção primária, ou seja, aquela que protege contra a doença, só se concretizará com a descoberta definitiva de sua etiologia. Enquanto não for atingido esse estágio, é necessário procurar exaustivamente recursos terapêuticos que atuem em fases precoces da fisiopatologia da doença, promovendo a profilaxia secundária, prevenindo o desenvolvimento de formas graves da doença. Novas pesquisas devem se concentrar na descoberta de fármacos capazes de proteger e recuperar o endotélio lesado (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; MEADS et al., 2008; CABRAL et al., 2009).

Tendo em vista os estudos realizados sobre a PE, verifica-se que o melhor tratamento ainda é assistência pré-natal adequada, diagnóstico precoce, controle apropriado e parto em tempo hábil, evitando as complicações mais graves (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005; SIBAI, 2003; BROWN, 2008; NHBPEPWG, 2000).

A PE é conhecida como a doença das teorias, mas pontos obscuros da sua gênese vêm sendo intensamente investigados e esclarecidos. O mecanismo gênese da PE ocorre muito cedo na gravidez (DEKKER; SIBAI, 2001) e por essa razão muito se investe em testes de predição fundamentados na disfunção placentária, nos marcadores de resposta inflamatória e ativação do sistema de coagulação e da lesão endotelial (CONDE-AGUDELO; ROMERO; LINDHERIMER, 2009; SIBAI, 2007; WANG; RANA; KARUMANCHI,

2009). Muitos marcadores biofísicos e bioquímicos têm sido propostos como preditores de pré- eclâmpsia (BAUMANN; BERSINGER; SURBEK, 2007).

A investigação do perfil lipídico realizada por métodos analíticos clássicos, por vezes apresenta limitações, neste sentido, há necessidades de análises lipídicas mais detalhadas, por isso é imperativo buscar novas ferramentas e metodologia, tanto para fins diagnósticos como para monitorização da eficácia terapêutica (QUEHENBERGER; DENNIS, 2011).

Além disso, o painel lipídico padrão, não é tão sensível e específico para a identificação de pacientes em risco para PE e suas complicações (ALSHEHRY et al., 2016), e com novas tecnologias metodológicas espera-se conhecer biomarcadores para uma identificação mais precisa e precoce dos pacientes de alto risco (HU et al, 2009).

Nas últimas décadas, a procura de biomarcadores de suporte à medicina translacional conduziu ao avanço científico das chamadas “ômicas”. O estudo do perfil metabólico de um organismo, a metabolômica, surge como a inovação mais recente depois da genômica, da transcriptômica e da proteômica. A lipidômica, a análise quantitativa e qualitativa dos lípidios no organismo, tem despertado o interesse da comunidade científica devido à sua íntima ligação com inúmeras patologias humanas ,tais como diabetes, obesidade, aterosclerose (KORKES et al, 2014; KOSTER et al, 2015; NOGUEIRA et al, 2018).

A lipidômica é o ponto final da cascata “omic” e é, portanto mais próximo do fenótipo do paciente (THOMAS, et al. 2011) e tem como objetivo realizar uma análise abrangente dos lipídios no sistema biológico e estudar em grande escala as estruturas e funções de uma variedade de lípidos (HU et al, 2009). A lipidômica é capaz de quantificar centenas de diferentes espécies moleculares lipídicas com várias funções estruturais e funcionais. Esta em combinação com amostras clínicas apropriadas e os dados do banco biomolecular que é usado hoje para atender as muitas necessidades não disponíveis de diagnósticos de doença (EKROOS et al, 2010).

Desta forma torna-se importante compreender as mudanças que ocorrem no perfil lipídico destas mulheres, e de que forma estas mudanças contribuem para o desenvolvimento da PE, podendo assim abrir caminhos para entender os mecanismos subjacentes. Sendo assim, o objetivo principal desta



pesquisa foi analisar o perfil lipídico, utilizando uma tecnologia não usual na prática clínica, denominada lipidômica, com a finalidade de estabelecer uma possível correlação com a PE.

Esta tese segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na parte inicial é apresentada o referencial teórico, objetivos e metodologia. Na segunda parte constam os resultados que são apresentados na forma de artigo e a terceira parte consiste das referências bibliográficas, apêndices e anexos.

Os resultados desta pesquisa deram origem a 02 artigos citados abaixo:

**1- Artigo original:**

Titulo: **SPHINGOLIPIDS AND PREECLAMPSIA DEVELOPMENT IN PREGNANT WOMEN IN SÃO LUIS, MARANHÃO.** Submetido ao periódico *Plos One* – Qualis A1 – Medicina I

**2- Artigo original:**

Titulo: **AVALIAÇÃO LIPIDÔMICA DO PLASMA DE MULHERES COM E SEM PRÉ-ECLÂMPSIA.** Submetido ao periódico *Cadernos de Saude Pública* – Qualis B2 – Medicina I

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

Em condições fisiológicas, a gestante depara-se com uma transformação brusca em seu organismo, apresentando principalmente alterações metabólicas de importância que podem lhe proporcionar risco aumentado de doenças e condições que prejudicam também a vida do feto em crescimento (BAKKER et al., 2001; IBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005; SIBAI, 2003).

Vários fatores concorrem para o desenvolvimento da SHEG, sendo a incidência maior quando presente em situações como obesidade, idade nos extremos da fase reprodutiva, diabetes, hipertensão, nefropatias, história familiar ou pessoal de PE ou eclampsia (MOURA; OLIVEIRA; DAMASCENO; PEREIRA, 2010).

A etiologia da SHEG é desconhecida, mais numerosos fatores e teorias têm sido sugeridos para explicar sua causa, porém a maioria não tem sido confirmada (NASCIMENTO; BOCARDI; ROSA, 2015). Dentre as formas clínicas que esta síndrome pode apresentar destaca-se a PE, definida pela presença de hipertensão e de proteinúria após a 20ª semana de gestação, podendo ser leve ou grave. Todavia, esta poderá ocorrer, excepcionalmente, antes de 20 semanas de gravidez quando associada à Neoplasia Trofoblástica Gestacional (NTG) (MOURA; OLIVEIRA; DAMASCENO; PEREIRA, 2010).

### **2.1 Definição e classificação das síndromes hipertensivas**

A Sociedade Internacional para estudos da hipertensão na gravidez (Internacional Society for the Study of Hypertension in Pregnancy – ISSHP) adota a classificação proposta pelo National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP), que também é a preconizada pelo Manual Técnico de Gestação de Alto Risco do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2010). Por esta categorização, as síndromes hipertensivas são classificadas em hipertensão gestacional, hipertensão arterial crônica, pré-eclâmpsia isolada ou superposta e eclampsia, de acordo com a época de surgimento da hipertensão e sua relação

com a idade gestacional, presença de proteinúria e gravidade do quadro clínico. Nesta recomendação, amplamente difundida, não foram mais utilizados os termos doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG) ou toxemia gravídica (BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015).

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) tem sido denominada de “A assassina silenciosa”, por ser uma doença crônica com uma longa fase assintomática que, se não detectada e não tratada, silenciosamente danifica o coração, o cérebro e os rins (HENTSCHKE, 2015; GOLDMAN; AUSIELLO, 2005). A HAS está relacionada com frequência a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo e às alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares, sendo considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

A hipertensão arterial (HA) provoca efeitos deletérios sobre diversos sistemas, principalmente o vascular, o hepático, o renal e o cerebral. As complicações observadas nesses sistemas torna a PE uma das principais causas de morte materna no Brasil com cerca de 37% das causas de morte obstétricas diretas. Outros estudos demonstram que a frequência da PE varia de 2 a 10% das gestações em todo o mundo (BROWN. et al., 2008; NHBPEPWG, 2000; LAURENTI; JORGE; GOTLIEB, 2004; SAFTLAS et al., 1990).

O termo “hipertensão na gravidez” é usualmente utilizado para descrever desde pacientes com discreta elevação dos níveis pressóricos, até hipertensão grave com disfunção de vários órgãos. As manifestações clínicas, embora possam ser similares, podem ser decorrentes de causas diferentes (BEZERRA et al, 2005).

A Hipertensão gestacional é definida como a hipertensão detectada pela primeira vez na segunda metade da gestação (após 20 semanas de gestação), na ausência de proteinúria. Sendo definida como a pressão arterial sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg ou pressão arterial diastólica (PAD) maior ou igual a 90mmHg, na prática frequentemente validada em duas aferições, ou uma medida isolada da PAD maior ou igual a 110 mmHg

(BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015). Geralmente, há melhora até três meses após o parto (TIMALSINA; GYAWALI; BHATTARAI, 2016).

A hipertensão gestacional que não se reverte neste período deve ser reclassificada como hipertensão arterial crônica (HAC) (TIMALSINA; GYAWALI; BHATTARAI, 2016), que pode apresentar-se anterior ao período da gestação, ser detectada antes de 20 semanas ou ainda aparecer tardiamente na gestação, porém não desaparece pós parto (sem limitação de tempo) (BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015).

A PE é definida como o estado hipertensivo após a 20ª semana associado à proteinúria significativa considerada como a excreção de proteína na urina igual ou maior que 300 mg nas 24 horas ou o achado de proteinúria em fita reagente em amostra isolada urinária de uma cruz ou mais, com desaparecimento até 12 semanas após o parto com a proteinúria e a pressão arterial devendo voltar ao normal. Ausente a proteinúria, suspeitar de PE (ENNEN; SATIN, 2010) quando houver presença de cefaleia, turvação visual, dor abdominal, ou exames laboratoriais alterados, como plaquetopenia e elevação de enzimas hepáticas (BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015; BRASIL, 2011; SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005; SIBAI; STELLA, 2009).

A PE superposta a HAC é quando mulheres com hipertensão crônica podem desenvolvem PE, que é diagnosticada quando ocorre piora da hipertensão ou da proteinúria, ou aparecimento de sinais e sintomas da PE após 20 semanas de gestação (NHBPEPWG, 2000; MEADS et al., 2008).

A eclampsia é definida como o princípio de convulsões em mulheres com hipertensão gestacional ou PE, desde que as crises tônico-clônicas não sejam atribuíveis a outras causas, como por exemplo, a epilepsia (ENNEN; SATIN, 2010; SOARES et al, 2009; SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005).

Estima-se que nos países em desenvolvimento, de 5 a 8% das mulheres com PE apresentam Eclampsia (VIANA; NOVAES; CALDERON, 2011; BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015). A morte pode ocorrer subitamente em decorrência de hemorragia cerebral volumosa ou por complicações associadas (BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015; BEZERRA et al, 2005). A literatura aponta aspectos que podem contribuir para a morte materna na eclampsia, tais como, erro médico (36%), falta de assistência pré-natal (19%), desencadeamento repentino (18%), falha do sulfato de magnésio (13%), ocorrência no puerpério

(12%) e em idade gestacional precoce (3%) (SIBAI et al, 1995), demonstrando que o aspecto multifatorial também está implicado nesta condição (AAGAARD-TILLERY; BELFORT, 2005), justificando que muitas mortes poderiam ser evitadas se ocorressem diagnósticos corretos e oportunos além de um plano de ação adequado, o que ampliaria também as chances do neonato (MOURA; OLIVEIRA; DAMASCENO; PEREIRA, 2010).

Os pilares do cuidado são representados pela manutenção do suporte de vida como oxigenação, volemia, equilíbrio ácido-básico, administração de sulfato de magnésio e hipotensores de ação rápida, se necessário, pois crises hipertensivas associadas à convulsão são frequentes, embora não seja uma condição exclusiva (HENTSCHE, 2015; ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014).

Estudo realizado no estado do Paraná constatou subutilização ou o uso inadequado de medicamentos consagrados no tratamento da PE grave e da eclampsia, inferindo a necessidade de qualificação da equipe profissional no manejo clínico desta patologia (SOARES et al, 2009).

A síndrome HELLP é uma entidade clínica, definida pelo acrônimo que a individualiza que significa hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetopenia (HENTSCHE, 2015, ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014; BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015). Pode estar presente em até 10% das mulheres com PE grave e eclampsia (JANNOTTI; SILVA; PERILLO, 2013).

A pesquisa desta patologia justifica-se desde a admissão da mulher hipertensa, podendo orientar estratégias do cuidado, visto que sua ocorrência se associa a elevada morbiletalidade materna causada por falência cardiocirculatória, coagulopatia, insuficiência renal e ruptura hepática (HENTSCHE, 2015) e com resultados perinatais desfavoráveis representados por prematuridade e asfixia (MOURA; OLIVEIRA; DAMASCENO; PEREIRA, 2010).

## **2.2 A Síndrome Hipertensiva Gestacional (SHG)**

De acordo com Steele (1867 apud HENTSCHE, 2015), em torno do ano de 1867, a SHG começou a ser estudada e publicada em artigos científicos, sendo já uma incógnita para as parteiras e médicos daquela época. Foi nesse período que começou a se pensar na hipóxia placentária como

possível desencadeadora de desfechos desfavoráveis para mãe e feto (HENTSCHKE, 2015; TOWNSEND; O'BRIEN; KHALIL, 2016). Desde então, o mundo tem pesquisado a SHG, em especial a PE, buscando uma teoria digna de causa e passível de tratamento. Nos últimos anos, segundo pesquisa em base de dados, são mais de 30 mil artigos publicados sobre PE envolvendo uma grande variedade de estudos (RANA; KARUMANCHI; LINDHEIMER, 2014; SHEVCHENKO; SIMONS, 2010).

No Brasil, a PE, é responsável por 37% das causas de morte obstétricas diretas. É uma complicação específica da gestação associada à hipertensão e proteinúria e que envolve a falência de diversos órgãos, atualmente é uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna e fetal, mortes perinatais, trabalho de parto prematuro e restrição do crescimento fetal (BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015).

Os achados clínicos da PE podem manifestar-se tanto com a presença de hipertensão, proteinúria, com ou sem outra patologia sistêmica associada, ou fetal, com restrição do crescimento intrauterino, oligodramnia e hipóxia fetal (ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014).

Ressalta-se que alguns estudos ainda demonstram que existem evidências de mulheres com PE desenvolverem riscos futuros de doenças cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio, doença isquêmica e tromboembolismo. Essas são as causas de maior morbidade e mortalidade perinatal (MOURA; OLIVEIRA; DAMASCENO; PEREIRA, 2010; YOUNG, LEVINE, KARUMANCHI, 2010; BAKKER; DELLES, 2013).

A PE tem sido considerada como uma síndrome, e não uma doença, causada por alterações isoladas ou combinadas, cujas alterações do endotélio vascular são reconhecidas como o processo central. Apesar de intensa investigação, testes de rastreio confiáveis ou tratamentos eficazes desta doença ainda têm de ser descobertos (RODIE, FREEMAN, SATTAR, GREER, 2004; SHEKHAWAT et al, 2003 ).

Apesar da fisiopatologia ainda ser desconhecida, é amplamente aceito, atualmente, o fato de que a isquemia da placenta é um fator primordial (CAVALLI et al., 2009). Alguns estudos sugeriram a existência de aspectos imunogenéticos com possível implicação do gene da síntese do óxido nítrico e do sistema humano antígeno leucocitários (HLA), considerados marcos iniciais

no processo fisiopatológico. Outro ponto importante é que esses fatores, juntamente com o endotélio, poderiam ser influenciados pelas grandes modificações gestacionais, como a ativação da cascata inflamatória normal na gravidez (REDMAN, 2011; SMITH, 2012; GUPTA; GUPTA, 2017; ILLSINGER et al, 2010).

A disfunção placentária é causada por uma invasão ineficiente do trofoblasto pelas artérias em espiral que não conseguem remodelar os vasos e permanecem como vasos de pequeno calibre, estes leva a uma restrição do fluxo sanguíneo placentário, ocasionando a hipoxia, favorecendo má adaptação e transformando o ambiente útero-placentário (HENTSCHKE, 2015, ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014; HUPPERTZ, 2007 ). A placentação inadequada resulta em redução do fluxo sanguíneo na unidade feto-placentária, o que pode interferir no crescimento do feto (BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015; WANG, RANA, KARUMANCHI, 2009; GUPTA; GUPTA, 2017; GALEWSKA et al, 2010).

A atividade inflamatória é um processo normal na gestação sem a presença de PE, com monócitos e granulócitos elevados. A exacerbação deste processo é um importante achado na patogenia da PE, embora não esteja totalmente esclarecido. Neste contexto, a presença de infecções (trato urinário, citomegalovírus, herpes) e doenças reumatológicas parece aumentar os riscos de desenvolvimento da patologia primordial (ILLSINGER et al, 2010; HAHN et al, 2006; ERMIN et al, 2013).

Nesse sentido e, tradicionalmente, a predição da PE têm sido baseada na avaliação da pressão sanguínea, proteinúria e edema, bem como na detecção de fatores de risco da gestante. Entretanto, várias gestantes que desenvolvem a doença não apresentam os fatores de risco, tornando necessária a obtenção de marcadores bioquímicos que podem predizer tal condição. Vários estudos tiveram como objetivo a identificação de marcadores. Entretanto, nenhum deles apresenta, atualmente, valor clínico (CAVALLI et al., 2009; ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014; WANG, RANA, KARUMANCHI, 2009; KORKES et al, 2014; KOSTER et al, 2015; NOGUEIRA et al, 2018).

A PE moderada é diagnosticada na presença de pressão arterial sistólica > 140 mm Hg ou diastólica > 90 mmHg, que ocorre após a 20ª semana

de gestação em pacientes previamente normotensas associado a proteinúria > 300mg em volume urinário coletado em 24h. Já a PE severa é diagnosticada na presença de pelo menos um dos seguintes critérios: pressão arterial sistólica > 160 mmHg ou diastólica > 110 mmHg medida em duas ocasiões, em intervalos de pelo menos 6h, com a paciente em repouso, proteinúria > 5 gramas em volume urinário coletado em 24h, oligúria < 500mL em 24h, sintomas visuais ou cerebrais (cefaleia, convulsões, distúrbios visuais e / ou alterações no nível de consciência) edema pulmonar ou cianose, dor epigástrica ou em quadrante superior, alteração da função hepática, plaquetopenia e restrição do crescimento fetal (CAVALLI et al, 2009; MOL et al, 2015).

No entanto, a heterogeneidade da sua origem e da sua apresentação (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM, 2000; REDMAN e SARGENT, 2010) muitas vezes trazem surpresa aos profissionais de saúde, que não conseguem evitar a alta morbimortalidade do binômio mãe-feto causada por essa síndrome (KHAN et al., 2006).

Sabe-se que algumas gestantes já possuem antes mesmo da gravidez, diagnóstico de Hipertensão Arterial Crônica (HAC), que se agrava durante a gestação, outras são previamente normotensas e passam a apresentar pressão elevada ao longo da gravidez, podendo cursar com proteinúria, consolidando assim os possíveis diagnósticos da SHG. No entanto, muita controvérsia existe em relação às definições e classificações da DHG, De acordo com as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, de 2017 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017) para as pacientes brasileiras e o relatório do High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (NHBPEPWG) (NHBPEPWG, 2000), os quais classificam a DHG de acordo com o Quadro 1.



**Quadro 1.** Classificação da Síndrome hipertensiva gestacional (NHBPEPWG, 2000)

Síndrome Hipertensiva Gestacional	Hipertensão*		Proteinúria**	
	IG < 20	IG > 20	IG < 20	IG > 20
Hipertensão gestacional	Não	<b>sim</b>	não	não
Hipertensão crônica	Sim	<b>Sim (+)</b>	não	não
Pré-eclâmpsia	Não	<b>sim</b>	não	<b>Sim (++)</b>
Pré-eclâmpsia sobreposta	<b>Sim</b>	<b>Sim (+)</b>	não	<b>sim</b>

**Fonte:** Hentschke (2015). \*PAS>140 mmHg e/ou PAD > 90 mmHg; \*\*Iniciou ou agravou a proteinúria patológica > 300mg/dia; ou relação P/C > 0,3; ou fita reagente: Proteinúria> +, que melhora ou cessa após 12 semanas do parto; ‡Resolução da hipertensão até 12 semanas do parto; †Hipertensão persistente após 12 semanas do parto. P/C: proteinúria/creatininúria em amostra. PAS: Pressão arterial sistólica. PAD: Pressão arterial diastólica. IG;Idade gestacional

Existem situações em que a PE pode apresentar-se sem proteinúria ou hipertensão, porém essas situações não foram consideradas no presente trabalho (HENTSCHKE, 2015; LINDHEIMER; ROBERTS, CUNNINGHAM, 2009). Dois por cento das mulheres com PE evoluirão para a eclâmpsia, levando a convulsões e potencial morte materna e fetal (SIBAI, 2003; ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014). Diante de um quadro de proteinúria e HAS, acima de 20 semanas de gestação, com sinais e sintomas clássicos da síndrome, se faz com certa facilidade o diagnóstico de PE, por exemplo (ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014; KUC et al, 2011).

## 2.3 Pré-eclâmpsia ( PE)

### 2.3.1 Epidemiologia

A PE é uma das três maiores causas de morbidade e mortalidade materna no mundo, afetando de 2% a 8 % de todas as gestações (HENTSCHKE, 2015, ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014; BERGAMO; ZEIGER; VIDAL, 2015; WHO, 2010; DULEY, 2009, GALÃO et al., 2004). Mesmo que nos últimos 50 anos tenha havido uma diminuição nas taxas de eclâmpsia, morbidade e mortalidade materna nos países desenvolvidos, as

estatísticas mostram que 98% das mortes ocorrem em países em desenvolvimento e permanecem ainda muito altas (WHO, 2010; GHULMIYYAH e SIBAI, 2012; ANAND et al, 2017; BAIG et al, 2013; BRYSON et al, 2003).

Sabe-se que a maioria das mortes e complicações maternas é devido à falta de cuidados no pré-natal, falta de acessos hospitalares, escassez de recursos, diagnóstico e manejo inapropriados dos pacientes com PE, o que é visto nos países em desenvolvimento (MOL et al, 2015; HAMMOUND et al, 2005).

Sabe-se ainda que mais de 10% das mulheres irão desenvolver PE na sua primeira gestação. Embora a grande maioria dessas pacientes tenha desfechos favoráveis, essa condição pode levar ao aumento de complicações sistêmicas graves, como hemorragia cerebral, disfunção hepática e renal aguda, e ainda edema agudo de pulmão, assim como descolamento prematuro de placenta, coagulação intravascular disseminada (CIVD), hemólise, hemorragia cerebral, crescimento intrauterino retardado (CIUR) e morte fetal (GARDOSI, 2012). O desenvolvimento de estratégias para prevenir, acompanhar e tratar pacientes com essa desordem tem sido um desafio devido ao entendimento incompleto da patogênese básica da doença (GHULMIUUAH e SIBAI, 2012; SMITH, 2012; WEBER et al., 2014).

### **2.3.2 Fatores de risco**

Devido à diversidade dos mecanismos de desenvolvimento da PE, sua patogênese pode diferir em mulheres com diferentes fatores de risco. A patogênese da paciente nulípara que desenvolveu PE, pode diferir da que desenvolveu a doença em gestação anterior, com doença vascular e/ou diabetes preexistente ou da gestação gemelar (MELLAND et al, 2015; ROMERO, 2003).

Ao longo dos últimos anos, estudos têm tentado identificar um marcador de risco para PE. No entanto, mesmo na falta de um bom candidato, é possível aconselhar as pacientes em relação ao seu potencial risco de desenvolver a doença através de sua história clínica (REDMAN, 2011; MISTRY et al, 2011). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da PE podem ser vistos no Quadro 2.

**Quadro 2.** Fatores de risco para síndrome de pré-eclâmpsia (PE)

Fatores de Risco	Comentários
<b>Evidência Forte</b> Primigestação Diabetes mellitus Gestação gemelar Irmã com PE Irmã, mãe ou avó com eclampsia HAS crônica PE sobreposta em gestação prévia Hidropisia fetal (não imune) Gestação molar Nova paternidade	RR: 2,4 (2,1 – 2,7) RR: 2 – 3 e maior se DM descompensado RR: 3 (2 – 4,2) RR: 3,3 (1,5 – 7,5) RR: Respectivamente 37, 26 e 16% de PE 25% de desenvolver PE sobreposta 70% de recorrência RR: 10 RR: 10 Risco semelhante ao da primeira gestação
<b>Evidência média ou fraca</b> IMC > 25,8 Idade materna > 40 anos Uso de método anticoncepcional de barreira Maior duração da atividade sexual Aborto prévio Ganho excessivo de peso Inseminação artificial “Homem de risco” (parceira anterior teve PE)	RR: 2,3 – 2,7 RR: 3-4 Aumento do risco Diminuição do risco Diminuição do risco Aumento de risco Aumento de risco RR: 1,8 (1,2 – 2,6)

**Fonte:** Martins-Costa (2011, p. 525) (SIBAI, DEKKER e KUPFERMINC, 2005; JUNIOR, 2009; FREITAS, 2011). RR: Risco relativo; IMC: Índice de massa corporal; evidência forte: vários estudos mostraram isso; evidência média ou fraca: alguns estudos mostraram associação.

### 2.3.3 Etiologia e fisiopatologia

A causa da PE ainda permanece desconhecida. Acredita-se que tenha origem multifatorial, embora uma das certezas seja a possível relação da placenta na sua fisiopatologia (ARCK; HRCHER, 2013; DEEVSKA et al, 2012; XIAO et al, 2012). Entre as explicações fisiopatológicas da PE encontram-se a isquemia placentária, o vasoespasmo generalizado, alterações na hemostasia com ativação do sistema de coagulação, disfunção do sistema vascular

endotelial, anormalidades no metabolismo dos lipídios e do óxido nítrico, ativação leucocitária, alterações nas concentrações séricas das citocinas assim como na resistência a insulina (DOBIERZEWSKA et al, 2016; HAHN et al, 2006).

Como resultado, as artérias espiraladas perdem sua elasticidade e aumenta seu diâmetro, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo, que tem função de atender as demandas crescentes do feto em desenvolvimento (HUPPERTZ, 2007). Na PE essa adaptação fisiológica não acontece provavelmente devido à insuficiente invasão trofoblástica. A vasodilatação das artérias espiraladas não ocorre e o fluxo uteroplacentário diminui levando a progressiva hipóxia placentária (JAUNIAUX; POSTON; BURTON, 2006).

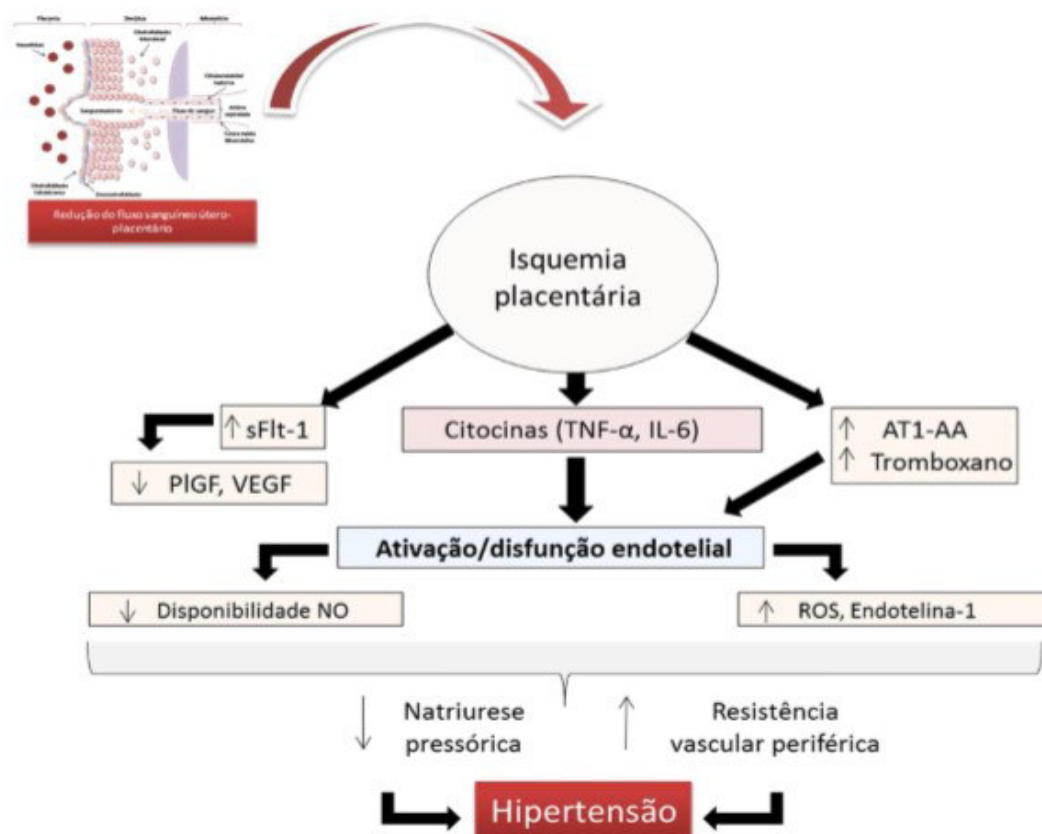
Vale à pena ressaltar que nem todas as pacientes com perfusão placentária reduzida desenvolvem a PE. Por esta razão, fatores maternos - genéticos e comportamentais / ambientais - devem ter o seu papel na etiologia da doença. Um forte componente hereditário já foi demonstrado ao avaliar-se resultados de gestações acometidas pela PE - mulheres nascidas dessas gestações estão predispostas a desenvolverem a doença nas suas gestações, e os homens ao engravidarem mulheres que terão PE (AMORIM et al., 2008; 2006; KATZ et al, 2008).

A fisiopatologia da doença permanece pouco entendida (BROUGHTON PIPKIN, 2012). Evidências demonstram que a placenta exerce uma participação fundamental no desenvolvimento da PE, visto que a dequitação é a única intervenção definitiva para o alívio dos sintomas e remissão dos mesmos. (SPIJKERS et al, 2010; 2011 ). Além disso, observa-se que não há necessidade da presença de feto, uma vez que está descrito na literatura a ocorrência de PE em casos de mola hidatiforme, na qual virtualmente não existe tecido fetal. Essa seria a única forma de PE antes de vinte semanas de idade gestacional (RANA; KARUMANCHI; LINDHEIMER, 2014; STAFF et al, 2013).

Em uma gestação normal, ocorre uma adaptação circulatória materno-fetal para que se produza uma circulação placentária de baixa resistência, resultando em um sistema circulatório de alto fluxo que na PE parece estar comprometido. Assim, as relações entre a circulação materna e fetal permanecem estreitas e muito pouco desenvolvidas. Conseqüentemente, o

fornecimento de sangue para a placenta é restrito, levando à disfunção na perfusão uteroplacentária, hipóxia e estresse oxidativo placentário, resultando em uma resposta inflamatória sistêmica com dano endotelial e desequilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores, levando à HAS (REDMAN e SARGENT, 2010; HENTSCHKE, 2015) (Figura 1).

**Figura 1.** Adaptação circulatória materno-fetal.



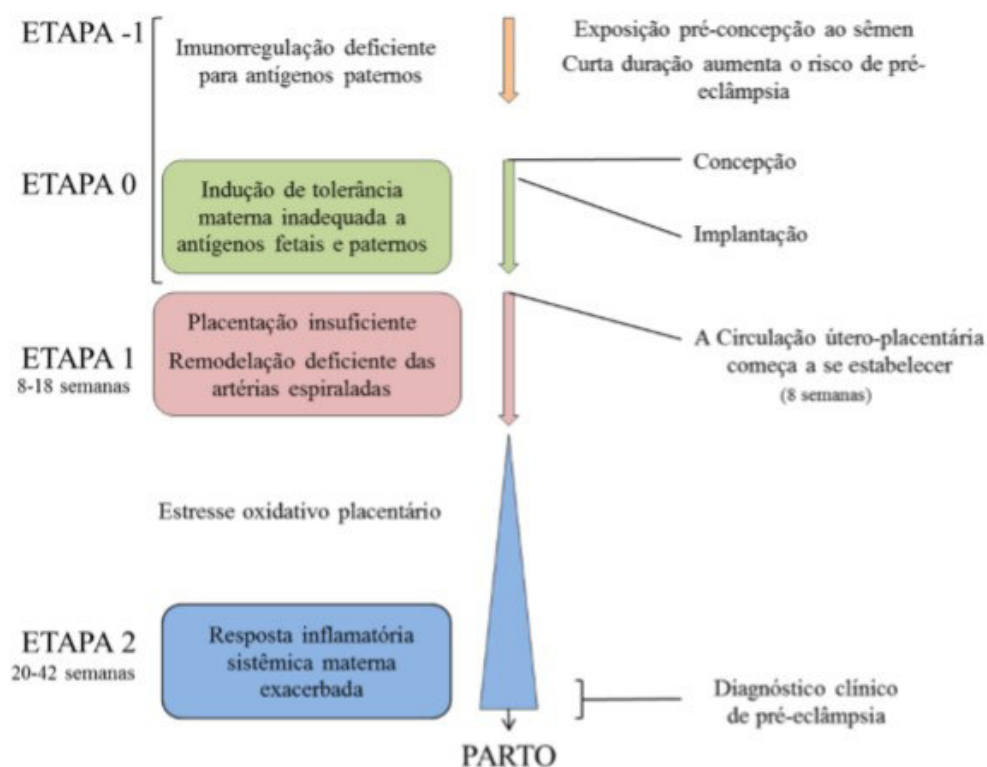
**Fonte:** Hentschke (2015), adaptado de Gilbert (2008). Vias através das quais a redução da pressão de perfusão uterina e a isquemia placentária podem levar à disfunção endotelial e cardiovascular durante a gravidez. A isquemia placentária resulta no aumento da síntese de Fms-like tirosina quinase solúvel 1 (sFlt-1), Fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e Interleucina (IL)-6, autoanticorpos do receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1-AA), e tromboxano. O aumento desses fatores parece resultar em disfunção endotelial pela diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e da endotelina-1, que por sua vez resulta em disfunção renal, aumento da resistência vascular periférica e, finalmente, em hipertensão. PIGF: Fator de crescimento placentário. VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

### 2.3.3 Pré-eclâmpsia: o modelo de dois estágios

Redman e Sargent (2010) propuseram pela primeira vez o modelo de dois estágios da PE, hoje amplamente aceito.

O primeiro estágio, má placentação, ocorre na primeira metade da gravidez, quando não há sinais clínicos da doença. Entretanto, nesse momento a análise com dopplervelocimetria de ondas nas artérias uterinas é capaz de detectar alterações que refletem nas artérias espiraladas a jusante e identificam um grupo de gestantes com alto risco para desenvolver PE. O segundo estágio, a doença clínica, surge a partir de fatores desencadeados pelo estresse oxidativo placentário. (Figura 2)

**Figura 2.** Modelos de estagio da PE



**Fonte:** Hentschke (2015), adaptado de Redman e Sargent (2010). Estágios do desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Etapas 1 e 2 de pré-eclâmpsia são atualmente aceitos. Estágios anteriores (-1 e 0) são hipotéticos. Estágio -1 compreende a tolerância materna pré-conceptual a antígenos paternos expressos no sêmen ou no esperma. Estágio 0 compreende o reconhecimento precoce de antígenos paternos expressos em trofoblasto imediatamente após a implantação, por células do sistema imunológico deciduais uterinas, no momento em que a

circulação uteroplacentária, „se abre“ para dentro do espaço intervilositário. Propõe-se que o reconhecimento deficiente leve à redução do crescimento do trofoblasto e da placenta.

#### **2.3.4 Pré-eclâmpsia: descobertas recentes e possíveis biomarcadores**

Estudos têm apontado diferentes possíveis biomarcadores para a PE, todos com objetivo de validar um teste diagnóstico com valor preditivo positivo, ou que consiga diagnosticá-la precocemente, a fim de evitar desfechos desfavoráveis para a mãe e o feto (CAVALLI et al., 2009; WANG, RANA, KARUMANCHI, 2009; MEIKLE; GERARD; KINGWELL, 2014; WRIGHT et al., 2012; KORKES et al, 2014; KOSTER et al, 2015; NOGUEIRA et al, 2018).

Muitos estudos falam a respeito de fatores angiogênicos, tais como Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e Fator de Crescimento Placentário (PlGF), como marcadores de PE em diferentes estágios da gravidez (GUPTA; GUPTA, 2017; GHOSH et al., 2012;2013; CHAPPELL et al., 2013; MAYNARD et al., 2013; GAIO et al.,2011; BAUMANN; BERSINGER, SURBEK, 2007).

Ainda, outro estudo mostrou o potencial de DNA-célula livre e DNA-célula fetal livre em plasma materno como um preditor de risco precoce para mulheres desenvolverem PE (PAPANTONIOU et al., 2013).

Há aqueles que estão analisando podócitos urinários em gestantes com PE (KONIECZNY et al., 2013; EKROOS et al.,2010), o MicroRNA-376c como mediador ou biomarcador (BAKER e DELLES, 2013), o Pentraxin 3 (PTX3) comparando com PE e CIUR (COZZI et al., 2012), e, ainda, há um grupo que analisou 14 potenciais diferentes biomarcadores de PE (LAPAIRE et al., 2012; ODIBO et al, 2011). No entanto, não há apenas estudos laboratoriais, mas também o uso da dilatação mediada por fluxo (DMF), que mostrou ser um marcador de prognóstico de gravidade de PE (VIEIRA et al., 2013).

No Quadro 3 estão apresentados alguns dos biomarcadores mais estudados nos últimos anos. Nenhum deles foi definitivamente aceito para tal fim na PE.

**Quadro 3.** Biomarcadores da pré-eclâmpsia (PE)

Concentração Plasmática				
Biomarcador	1º trimestre	2º trimestre	Manifestação PE	Outras patologias relacionadas
sFlit-1	-	↑	↑	-
sEng	-	↑	↑	HELLP; PIG
PIGF	↓	↓	↓	PIG; CIUR
PP-13	↓	↑	↑	CIUR; Parto pre termo
DNA-célula fetal	↑	↑	↑	CIUR; polidrâmnio; Trissomia do 21
PTX3	↑	↑	↑	CIUR
PAPP - 2	↑	↑	↑	Peso fetal
Visfatina	-	↓↑	↓↑	DM2; obesidade; CIUR

**Fonte:** Martins-Costa (2011, p. 531)( FREITAS, 2011; KUC *et al.*, 2011). sFlit-1: Fms-like tirosina quinase solúvel 1; sEng: Endoglina solúvel; PIGF: Fator de crescimento placentário; PP-13: Proteína Placentária 13; PTX3: Pentraxin 3; PAPP-2: Pappalysin-2. HELLP: Hemolytic anemia; Elevated Liver enzymes; Low Platelet count; PIG: Pequeno para idade gestacional; DM2: Diabetes mellitus tipo 2.

Sabendo disso, biomarcadores sanguíneos, em uso ou novos, são de grande valia. Os níveis sanguíneos de glicose, hemoglobina glicada (HbA1C), colesterol (total, HDL e LDL), triglicerídeos (TG), proteína C reativa ultrasensível, alfa-1-glicoproteína-ácida, contagem de leucócitos (Hemograma), dentre outros, são importantes parâmetros em uso na rotina do diagnóstico laboratorial. Tais parâmetros podem ser utilizados isoladamente ou em associação como, por exemplo, nas relações TG/ HDL-C e LDL-C/HDL-C, apontando a incidência de doença cardiovascular (CAVALLI *et al.*, 2009; MOL *et al.*, 2015).

Em 2011 foi publicada uma revisão sistemática em que se analisaram marcadores séricos de primeiro trimestre para PE e ainda foi comparada a dopplervelocimetria de artérias uterinas. Nesse estudo, foram analisados os sete biomarcadores mais estudados até aquele momento (a desintegrina e metaloproteinase Domínio 12 [ADAM12], subunidade Livre  $\beta$  da gonadotrofina coriônica humana [ $\beta$ -hCG], Inibina A, Activina A, Proteína placentária 13 [PP-13], PIGF, e Papalisina A [PAPP-A]) e Doppler de artérias uterina. Baixos níveis de PP- 13, PIGF, PAPP-A e altos níveis de Inibina-A foram encontrados como



significativamente associados com o desenvolvimento de PE no final da gestação. Quando os biomarcadores foram dosados em conjunto, a taxa de detecção variou de 38% a 100%, mostrando que múltiplos marcadores em associação poderiam prever a PE (KUC et al., 2011).

Levine e Karumanchi (2004) descreveram o papel do FMslíke tirosina quinase solúvel 1 (sFlt-1), presente em níveis muito mais elevados no sangue de mulheres com PE do que nas mulheres que não apresentaram a doença. Foi teorizado que o sFlt-1 agiu como uma “isca”, capturando PIGF e VEGF de modo que não pudessem se ligar aos receptores Flt-1 nas paredes dos vasos sanguíneos. Privados de PIGF e VEGF, os vasos sanguíneos se deterioraram. De acordo com essa teoria, a deterioração de vasos sanguíneos foi a base para o aumento da pressão arterial e dos outros sintomas da PE. Os pesquisadores também mostraram que os níveis de sFlt-1 começaram a subir cerca de cinco semanas antes das mulheres desenvolverem PE (VENKATESHA. et al, 2006).

Ainda, mostrou-se que os níveis de PIGF na urina de mulheres que desenvolveram PE começaram a cair em torno da 25ª semana de gravidez. Karumanchi et al (2001) mostraram ainda que uma segunda substância, Endoglina solúvel (sEng), também estava presente em placentas de mulheres com PE. Tal como aconteceu com o Flt-1 e sFlt-1, as formas fixas e livres da molécula foram encontradas em vasos sanguíneos (VENKATESHA. et al, 2006)

O receptor Eng era um ponto de ancoragem para uma molécula conhecida como fator transformador de crescimento beta ( $TGF\beta$ ), também necessário para manter os vasos sanguíneos saudáveis. Novamente, a circulação livre sEng agiu como um chamariz, desviando  $TGF\beta$  para longe dos vasos sanguíneos. Privados de  $TGF\beta$ , os vasos sanguíneos tornam-se menos elásticos. Por fim, tanto sEng quanto a relação sFlt1/PIGF alteradas parecem contribuir para o desenvolvimento da PE (JUNIOR, 2009).

Assim, a produção placentária de sFlt-1 e sEng parecem ser marcadores de PE. Esses fatores antiangiogênicos placentários são liberados na circulação materna; suas ações alteram o endotélio materno e resultam em hipertensão, proteinúria e outras manifestações sistêmicas da PE (DULEY et al., 2009).

Estudos mostraram ainda que o aumento do sFlt-1 e sEng estão diretamente correlacionados a resistência da artéria uterina, especialmente nas pacientes com PE precoce (TOBINAGA et al., 2014, HENTSCHKE, 2015; MYERS et al, 2013; SMITH, 2012).

Ainda em relação aos novos biomarcadores, tem-se o estudo de Xia e colaboradores (XIA e KELLEMS, 2011; 2013), que investigaram anticorpos no sangue de mulheres com PE. Os anticorpos são moléculas em forma de Y produzidas pelo sistema imunológico. A teoria de Xia sustenta que, por razões que não são bem compreendidas, a mãe produz anticorpos para o receptor de angiotensina II. Os anticorpos atravessam a placenta e estimulam suas células a produzir sFlt-1, que, juntamente com outros compostos da placenta, entram na circulação materna, impedindo o desenvolvimento placentário e, em seguida, ocasionando o aumento da pressão sanguínea e de outros sintomas da doença. Em estudos de laboratório, os pesquisadores descobriram que poderiam bloquear o anticorpo e impedi-lo de chegar ao receptor da angiotensina II. Dessa forma, acreditam que pode ser possível tratar a PE.

Nas últimas décadas, a procura de biomarcadores de suporte à medicina translacional conduziu ao avanço científico das chamadas “ômicas” (WENK, 2010). O estudo do perfil metabólico de um organismo, a metabolômica, surge como a inovação mais recente depois da genômica, da transcriptômica e da proteômica. Por um lado, sabendo que o fenótipo de um determinado organismo depende dos metabolitos secundários expressos por este, podemos observar num determinado contexto biológico os resultados analíticos de interações celulares, tanto no tempo, como no espaço. Além disso, o fato desta análise poder ser trabalhada quantitativamente facilita o enquadramento das alterações, por vezes sutis, dos níveis basais para níveis patológicos, ou permite visualizar uma resposta adaptativa a uma agressão externa ou a uma intervenção terapêutica (CAVALLI et al., 2009; ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014; WANG, RANA, KARUMANCHI, 2009; KORKES et al, 2014; KOSTER et al, 2015; NOGUEIRA et al, 2018).

Dentre as várias componentes da metabolômica, pode destacar-se a lipidômica, que mais recentemente tem despertado o interesse da comunidade científica. Tal interesse deve-se à íntima ligação a inúmeras patologias humanas (tais como diabetes, obesidade, aterosclerose, doença de Alzheimer),

a distúrbios lipídicos, levando a que se questione cada vez mais o papel destes metabólitos na homeostase celular (ROCHA; LOPES; PEREIRA, PINTO, 2014; KORKES et al, 2014; KOSTER et al, 2015). Por sua vez, a lipidômica está subdividida em diferentes áreas de estudo, dentro das quais a esfingolipidômica. A ceramida e as esfingosina-1-fosfato (S1P) são esfingolipídios bioativos essenciais em inúmeras cascatas de sinalização molecular (DONG et al, 2014)).

A variedade estrutural e funcional dos metabólitos lipídicos sejam esfingolipídios, glicolípidos, ou outros, tornam bastante complexa a sua abordagem analítica. Como exemplo, encontramos desde lipídeos apolares (ex. ésteres de esteróis) a lipídios polares (ex. fosfolípidos), passando pelos lipídeos neutros (ex. triacilglicerídeos) numa mesma matriz (TRANQUILLI et al, 2014).

### **2.3.5 Lipídios, lipoproteínas e a gestação**

No início da gravidez, há um aumento no acúmulo de gordura corporal, associado tanto à hiperfagia quanto ao aumento da lipogênese. Posteriormente, há uma degradação acelerada de depósitos de gordura materna, que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento fetal (HERRERA, 2002), resultando numa situação fisiológica chamada de hiperlipidemia gestacional (HERRERA, 2002; HERRERA *et al.*, 2006; DESOYE, GAUSTER e WADSACK, 2011).

Essa condição é observada a partir da décima primeira semana de gestação, quando fosfolípidios, colesterol total (CT), LDL, HDL e TG aumentam em resposta à estimulação estrogênica e à resistência insulínica (CT: aumento de aproximadamente 25-50%; e TG: aumento de aproximadamente 300%) (HERRERA, 2002; GHIO *et al.*, 2011).

Os níveis de lipídios também são afetados pelo aumento da progesterona e do hLP – hormônio produzido na placenta com função de crescimento, lactação e produção de esteróides lúteos, além de ser um antagonista da insulina (ALVAREZ *et al.*, 1996). No entanto, embora o colesterol materno seja uma fonte importante para o feto durante o início da

gestação, sua importância torna-se mínima durante a fase final da gravidez, devido à elevada capacidade de tecidos fetais em sintetizar o colesterol.

Sabe-se que a hiperlipidemia materna pode contribuir positivamente para o crescimento e o desenvolvimento fetal (GHIO *et al.*, 2011). É possível que em gestações complicadas com acúmulo excessivo (DM) ou reduzido (CIUR) de gordura fetal ocorram distúrbios do metabolismo lipoproteico materno na tentativa de compensar possíveis distúrbios fetais (DESOYE, GAUSTER e WADSACK, 2011).

Ainda, acredita-se que a maior concentração de TG durante a gestação tenha relação com maior risco de desenvolver PE (CHARKIEWICZ *et al.*, 2017), prematuridade e CIUR (GHIO *et al.*, 2011; PECKS *et al.*, 2012). Outros fatores, como o Índice de Massa Corporal (IMC), o ganho de peso materno, a nutrição materna, os níveis lipídicos pré-gravídicos e as várias complicações patológicas gestacionais, também podem alterar os níveis de lipídios e de lipoproteínas no plasma materno (ALVAZES *et al.*, 1996).

Em uma revisão de 22 estudos, Ray e colaboradores (RAY *et al.*, 2006) relataram que mulheres com elevado TG tinham o dobro do risco de desenvolver PE, sendo que em quatro desses estudos – aqueles ajustados para fatores de confusão (idade materna, IMC e paridade) – o risco apresentado foi quatro vezes maior em comparação às mulheres com TG normais. Um aumento dos TG e LDL podem contribuir com o estresse oxidativo e com a disfunção endotelial observada em pacientes com PE, o que foi observado também em um estudo brasileiro que apresentou maiores concentrações de VLDL e de triglicérides em pacientes com PE (LIMA, *et al.*, 2011).

Os lipídeos são moléculas insolúveis em água que tem muitas funções biológicas fundamentais: atuam como componentes estruturais das membranas celulares participam da manutenção dos gradientes eletroquímicos e como mensageiro na sinalização celular, servem como fonte de armazenamento de energia e transportam proteínas (FAHY *et al.*, 2011).

Além disso, muitos lipídeos podem atuar como ligantes endógenos e receptores específicos e então agem como iniciadores de resposta imunológica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; KORKES *et al.*, 2014). O plasma humano é composto por ácidos nucleicos, aminoácidos e lipídeos. Dentre os vários

metabólitos celulares, os lipídeos se destacam devido a sua diversidade estrutural e ao grande número de espécies moleculares distintas. Aproximadamente 600 espécies moleculares já foram quantificadas, incluindo oito categorias principais (QUEHENBERGER; DENNIS, 2011).

As moléculas lipídicas foram classificadas pelo Comitê internacional para Classificação e Nomenclatura de Lipídeos em categorias, com base em suas funções químicas em: 1) Ácidos Graxos, 2) Glicerolipídeos, 3) Glicerofosfolipídeos, 4) Esfingolipídeos, 5) Lipídeos Esteróis, 6) Lipídeos Prenois, 7) Sacarolipídeos e 8) Policetídeos. Cada categoria é subdividida em classes e subclasses principais ( FAHY et al., 2011).

Todavia, os lipídeos são representados principalmente pelos Ácidos Graxos livres (AGL), TG, Fosfolipídios, colesterol livre (CL) e esterificado (CE) (QUINTÃO et al., 2011).

O *National Institute of Diabetes e Digestive and Kidney Diseases*, em colaboração com o *National Institute of Standards*, produziram um material padrão de referência de plasma humano para análise de metabólitos, a partir de amostras de plasma de 100 indivíduos entre 40 e 50 anos de idade. E pela primeira vez, um perfil lipídico sem profundidade do plasma humano revela a enorme diversidade de lipídeos compreendendo seis categorias principais conforme definido no Lipid Maps (QUEHENBERGER et al., 2010).

Os esfingolipídios no plasma humano consistem de mais de 200 espécies. A maior fração é a esfingomielina (SM), enquanto a menor é ceramidas (CER) (RAI; BHATNAGAR, 2017). São particularmente abundantes no tecido nervoso, e estão relacionados a uma série de doenças neurológicas, tais como desordens bipolares, esquizofrenia e doenças neurodegenerativas. Estes distúrbios estão associados ao metabolismo lipídico desregulado, como já observado na doença de Alzheimer, onde o metabolismo do colesterol encontra-se alterado (WENK, 2005; QUEHENBERGER; DENNIS, 2011).

Níveis elevados de esfingomielinas e de ceramidas, metabólitos pertencentes a esta classe, estão associados a doença de Alzheimer, doenças coronarianas, diabetes tipo 2 e gravidade da doença de Gaucher (QUEHENBERGER; DENNIS, 2011).

Os glicerofosfolipídeos constituem a maior classe de lipídeos (RAI; BHATNAGAR, 2017). Representam os principais componentes da membrana

celular e servem como precursores para moléculas de sinalização celular e em outros processos fisiológicos. Fazem parte desta classe os fosfolípidos, que são abundantes e heterogêneos, dentre eles podemos citar: ácido fosfatídico, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidilglicerol, fosfatidietanolamina, fosfatidilinositol e cardiolipinas (WENK, 2005). Níveis elevados de fosfolípido, tem sido relacionados a vários tipos de câncer e tem sido alvo de pesquisa em busca de terapias anticancerígenas (QUEHENBERGER; DENNIS, 2011).

Muitos metabólitos de esfingolípídios e fosfolípídios tem sido implicados como componentes críticos que ligam a obesidade à resistência à insulina, Diabetes Mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (MEIKLE; SUMMERS, 2016).

Os glicérolídeos são responsáveis por uma proporção elevada de lípidos totais no plasma, compreendem os triacilglicérolis e monoacilglicérolis. Os Triacilglicérolis atuam como um reservatório de energia celular e sua concentração no plasma é dependente da ingestão de alimentos. Espécies de TG têm sido correlacionadas a obesidade e a resistência a insulina (QUEHENBERGER; DENNIS, 2011).

Os principais constituintes da classe dos ácidos graxos são os AGL, que são espécies metabolicamente ativas e constituem uma pequena fração de todos os lípidos plasmáticos. O tecido adiposo é o principal repositório de AGL e reflete a quantidade consumida na dieta (RAI; BHATNAGAR, 2017). Estudos em animais e humanos tem mostrado que os ácidos graxos monoinsaturados e saturados aumentam o risco de arritmia ventricular e morte súbita, ao passo que os ácidos graxos poli-insaturados, e n-3 ácidos graxos em particular, previnem ação arritmogênica, com uma redução significativa no risco de morte por origem cardíaca (QUEHENBERGER; DENNIS, 2011).

Da classe dos esteróides, o colesterol é o mais abundante no plasma e existe em ambas as formas, livre e esterificada. No plasma, o colesterol está associado com lipoproteínas, sendo amplamente utilizado para prever o risco de eventos cardiovasculares (QUEHENBERGER; DENNIS, 2011).

Algumas alterações no perfil lipídico, em diferentes fatores causais da dislipidemia não familiar já foram observadas, como grandes mudanças nos níveis de Lisofosfatidilcolina (LPC), Fosfatidilcolina (PC), monoglicérolis e triacilglicérolis. Os níveis de esfingomielina e ceramidas encontravam também

aumentados (RAI; BHATNAGAR, 2017). Em pacientes com Doenças Cardiovasculares (DCV) foram observados altos níveis de AGL, CER e SM (RAI; BHATNAGAR, 2017).

Abordagens analíticas inovadoras, em particular, espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida tem sido usada para análise de lipídeos nos sistemas biológicos, e com isso uma variedade de aplicações, como o desenvolvimento de biomarcadores e de novas drogas, o que tem tornado este campo uma área promissora para a pesquisa biomédica ( WENK, 2005).

Os nomes e abreviaturas dos lipídeos foram atribuídos de acordo com a nomenclatura do Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org>), que seguem as diretrizes da União Internacional de Químicos Puros e Aplicados e pela Comissão Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUPAC-IUBMB)

### **2.3.7 Lipidômica**

A identificação e quantificação de proteínas e lipídios é de grande importância para o diagnóstico, prognóstico e compreensão de mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença. Em diferentes estágios do desenvolvimento da síndrome hipertensiva, lipídios e proteínas desempenham importante papel nos mecanismos subjacentes. Estas duas classes de biomarcadores podem ser diferentemente monitorados por um ponto de vista holístico por abordagens “ômicas” denominados proteômica e lipidômica. A lipidômica é o ponto final da cascata “omic” e é, portanto mais próximo do fenótipo do paciente (THOMAS, et al. 2011) e tem como objetivo realizar uma análise abrangente dos lipídios no sistema biológico e estudar em grande escala as estruturas e funções de uma variedade de lípidos (HU et al, 2009).

A lipidômica é capaz de quantificar centenas de diferentes espécies moleculares lipídicas com várias funções estruturais e funcionais. Esta em combinação com amostras clínicas apropriadas e o dados do banco biomolecular é usado hoje para atender as muitas necessidades não

disponíveis de diagnósticos de doença (EKROOS et al, 2010). Lipídios são constituintes celulares essenciais, têm muitas funções no interior das células e regulam vários processos biológicos (MONTANI et. al, 2012).

A importância fisiológica de lipídios é ilustrada pelas numerosas doenças que apresentam anormalidades lipídicas, incluindo a diabetes, aterosclerose, obesidade, e doença de Alzheimer (HU et al, 2009; NICHOLSON; LINDON, 2008; KE et al.,2015). Dos pontos de vista fisiológico e clínico, os lipídeos biologicamente mais relevantes são os fosfolípidios, o colesterol, os triglicérides e os ácidos graxos. Os fosfolípidos formam a estrutura básica das membranas celulares. As classes de lipídeos complexos já identificados em análise lipidômica incluem: Lisofosfolocolina (LPC), Fosfatidilcolinas (PC), Esfingomielinas (SPM), Fosfatidiletanolamina (PE), ésteres colesteril (ChoE), diacilglicerol (DG) e Triacilglicerol (TG). Estudo realizado por Hu e cols identificaram 81 espécies de lipídeos distribuídas nestas 07 classes, estando a classe TG a mais aumentada em pacientes hipertensos quando comparado aos normotensos ( HU et al, 2009).

A tecnologia lipidômica permite uma capacidade na investigação de lipídios em que as alterações de perfis lipídicos podem estar associadas a doenças e alterações no metabolismo dos lipídios ou de modulação por via de lipídios devido a doenças poderem ser detectadas em sistemas biológicos complexos. Isto proporciona novos conhecimentos, por exemplo, doenças metabólicas e inflamatórias, bem como o papel dos lipídios em sistemas biológicos em geral (HU et al, 2009).

Esta técnica da lipidômica integrada com a genômica, proteômica, metabolômica poderá contribuir para a compreensão de como os lipídios funcionam em um sistema biológico e poderá fornecer uma ferramenta poderosa para a elucidação do mecanismo de lipídios nas doenças, para a seleção de biomarcadores e para monitorização terapêutica farmacológica (KE et al.,2015). Devido à complexidade do campo "ômicas", com inúmeros compostos dinâmicos para caracterizar e monitorar, o desenvolvimento de estratégias de análise e adaptação de dados mínimos constitui um grande desafio onde a espectrometria de massa (MS) é considerada uma ferramenta poderosa (THOMAS et al , 2011).



A lipidômica é um campo de pesquisa relativamente recente, que tem sido impulsionada por avanços em tecnologias de análise, em particular, a espectrometria de massa (EM) e métodos computacionais. Consiste não somente de uma caracterização completa de todos os lipídeos num tipo de célula ou tecido em particular, mas em uma compreensão abrangente da influência de todos eles no sistema biológico (KE et al.,2015). E devido a essa capacidade já é utilizada em estudos para identificar perfis metabólicos associados as atividades biológicas, estado fisiológico e doenças ( NICHOLSON; LINDON, 2008; KE et al.,2015).

A palavra “lipidoma” é usada para descrever o perfil lipídico completo dentro de uma célula, tecido ou organismo, é um subconjunto da “metabolômica” que inclui também as outras três classes principais de moléculas biológicas, aminoácidos, açúcares e ácidos nucleicos ( WATSON, 2006; FAHY et al.,2011).

Na análise lipidômica é utilizado equipamentos como cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa que junto combinam as vantagens de alta seletividade e eficiência de separação com obtenção de informação estrutural, massa molar que são muito importantes para identificação dos lipídeos alterados ou não em sistema biológico (CHIARADIA et al., 2008).

Dois abordagens podem ser aplicadas nos estudos lipidômicos, uma é o perfil de análise lipídica global e a outra é a abordagem direcionada, que consiste em estudar um conjunto discreto de lipídeos biologicamente relevantes. Para a caracterização global, comumente são utilizados espectros de massa do tipo MALDI TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), Q-TOF (*quadrupole time-of-flight*) e Orbitrap (íon trap). Para uma abordagem de análise de lipidoma direcionada, é frequentemente empregada a espectrometria de massa tipo triplo quadrupolo-TOF. O monitoramento de reação múltipla (MRM) foi desenvolvido para medir também lipídeos com íons precursores e íons de produtos conhecidos. A espectrometria de Massa/MRM aumenta a sensibilidade de detecção e permite a detecção e quantificação de lipídeos em níveis muito baixos em amostras biológicas (HUANG et al.,2014).

Uma vez que, os lipídeos desempenham diversas funções na fisiologia dos mamíferos, o potencial da lipidômica neste campo diz respeito

principalmente a: identificar novos mecanismos químicos responsáveis pela iniciação do processo de doenças; entender os determinantes moleculares responsáveis pela progressão do estado de doença; determinar os tipos de regimes disponíveis de tratamento que são bem sucedidos e finalmente avaliar a eficácia do regime de tratamento escolhido, através da quantificação de alterações resultantes após a terapia (NAVAS-IGLESIAS et al.,2009).

Ademais, a indústria farmacêutica também pode se beneficiar da abordagem lipidômica, uma vez que os lipídeos representam moléculas-chave de sinalização de processos fisiológicos e doenças. Assim, esta tecnologia pode ser utilizada para encontrar novos medicamentos, por meio da descoberta de novos metabolitos e mecanismos de ação, ou, alternativamente, identificando quaisquer efeitos tóxicos do fármaco, que às vezes é oculto pelas limitações das práticas farmacêuticas correntes. No que diz respeito a biomarcadores, esta metodologia pode promover a detecção precoce de doenças e facilitar o desenvolvimento de kits para métodos diagnósticos (NAVAS-IGLESIAS et al.,2009).

Estudos nas mais diversas áreas tem utilizado a metabolômica ou lipidômica para entender melhor o processo saúde-doença, assim como para identificar melhores preditores de determinadas doenças, evidência disso, são as várias publicações, provenientes de estudos transversais e de grandes coortes, que surgiram nos últimos anos sobre o tema ( HU et al.,2011; DE OLIVEIRA et al.,2012; GONZALEZ-COVARRUBIAS et al.,2013; AURO et al.,2014; KE et al.,2015, HAVULINNA et al.,2016).

Hu et al. ( 2011), ao estudar o perfil de lipídeos no plasma de pacientes tratados (n=25), não tratados (n=30) para hipertensão essencial, e indivíduos com pressão normal (n=28), revelaram grupos distintos entre os indivíduos estudados, ou seja, os lipídeos fosfatidilcolinas e triacilglicéris dominaram o padrão do perfil lipídico influenciado pela hipertensão. Os triacilglicéris estavam significativamente aumentados em 49% dos pacientes hipertensos quando comparados ao grupo de pressão normal, com tendência a diminuir em hipertensos após o tratamento. O colesterol esterificado estava significativamente menor em 16,9% em hipertensos após o tratamento.

Da coorte *Cardiovascular Malmo Diet and Cancer Study in Sweden*, um estudo de prevenção primária, foram selecionados 211 casos de DCV e 216

controles para avaliação dos lipídeos, sendo que 85 espécies lipídicas foram identificadas e quantificadas, cujos níveis de lisofosfatidilcolinas, esfingomielinas e triacilgliceróis foram associados a eventos cardiovasculares. Na classe de lisofosfatidilcolina, as espécies LPC 16:0 e LPC 24:4 foram associadas com a redução do risco de desenvolver DCV durante os 12 anos de seguimento ( FERNANDEZ et al.,2013).

No *Bruneck Population Study* in Austria, 135 espécies lipídicas, como o colesterol esterificado, fosfatidilcolina, esfingomielinas e triacilgliceróis foram associados com 90 incidentes cardiovascular observados no período de 10 anos. A associação negativa foi observada com a lisofosfatidilcolina, tal como estudo de *Malmo* ( STEGEMANN et al, 2014).

Em um caso controle realizado com 113 indivíduos, sendo 23 deles portadores do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o perfil lipídico revelou que no grupo com HIV positivo, o diacilglicerol mostrou uma associação positiva com eventos cardiovasculares e este foi acompanhado por associações positivas em sete outras classes lipídicas: ceramidas, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidiliunisol, fosfatidilglicerol, colesterol esterificado e triacilglicerol ( WONG et al.,2014).

Alshehry et al. (2016) realizaram o maior estudo lipidômico relatado até o momento, avaliando mais de 300 espécies lipídicas em mais de 4000 amostras de dois estudos clínicos prospectivos independentes (ADVANCE e LIPIDS), cujos os participantes tinham diabetes mellitus tipo 2 com um ou mais fatores de risco cardiovasculares adicionais, que identificaram 03 classes/ subclasses de lipídeos significativamente associadas com o risco de eventos cardiovasculares ( monohexosilceramida, dihexosilceramida e lisoalquilfosfatidilcolina). Além disso, 32 espécies lipídicas individuais foram significativamente associadas com o risco de eventos e mortes cardiovasculares. Destacaram-se os lipídeos das classes de esfingolípídeos, fosfolípídeos ( incluindo espécies liso e éter), ésteres de colesterol e glicerolípídeos.

A espectrometria de massa se tornou uma técnica chave em plataformas analíticas para investigações nas áreas da proteômica e lipidômica, devido à sua seletividade e sensibilidade. Usando esta técnica, várias estratégias têm sido desenvolvidas com base em abordagens inespecíficas ou específicas para enfatizar ou monitorar moléculas de interesse

de matrizes biológicas. Embora estas abordagens tenham sido amplamente empregadas na pesquisa do câncer, este tipo de investigação tem apresentado um grande interesse no campo das doenças cardiovasculares, potencialmente levando à descoberta de novos biomarcadores e o desenvolvimento de novas terapias (THOMAS et al , 2011).

A Espectrometria de Massa de ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI- MS) tem sido utilizada com sucesso como uma ferramenta para a análise da composição lipídica porque proporciona resultados em pouco tempo, com um grau mínimo de fragmentação do analito, o que permite a análise das estruturas altamente complexas.

Espera-se que com a introdução da lipidômica em estudos biomédicos, isto poderá promover a detecção de alvos para novas drogas e possibilitar o monitoramento daquelas que afetam o metabolismo de forma lipídica diferenciada.

### **3. METÓDOS**

#### **3.1 Tipo do estudo**

Trata-se de um estudo caso-controle, realizado no período de junho a novembro de 2016, no Serviço de Obstetrícia – Pré-Natal Especializado de uma Maternidade, no município de São Luís, Maranhão, na região nordeste do Brasil. O estudo é parte do Projeto chamado “Biomarcadores cardiovasculares em gestantes com pré-eclâmpsia”.

#### **3.2 População do estudo**

Composta por gestantes com faixa etária superior a 18 anos e idade gestacional (IG) igual ou superior a 20 semanas. A amostra foi dividida em 2 grupos: um grupo “pré-eclâmpsia” (n = 20), outro grupo sem pré –eclampsia denominado "normais" (n = 20).

### 3.3 Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue dos sujeitos de pesquisa. Para coleta de sangue, estabilização e transporte das amostras foi realizada com o kit PAXgene Sangue RNA Tubos (Qiagen, NL), segundo o protocolo da empresa fabricante.

O processamento das amostras sanguíneas para extração do soro foi realizado com a manutenção destas por 20 minutos em temperatura ambiente (18 a 24° C, média de 22° C) e posterior centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm. O soro separado foi distribuído em criotubos, que foram congelados e estocados em freezer a -70° C, para dosagem em um mesmo momento de todas as variáveis séricas.

### 3.4 Análise lipidômica

Uma abordagem metabolômica alvo foi aplicada utilizando o ensaio lipídico foram analisadas pelo laboratório *Biocrates Life Science AG* (Innsbruck, Áustria), de acordo com o protocolo padrão interno. As classes lipídicas foram analisadas quantitativamente em 40 amostras de soro humano. Para determinar os metabólitos lipídicos, as amostras (soro) foram centrifugadas e o sobrenadante foi usado para análise. A preparação da amostra do volume da amostra de 20 µL foi seguida por protocolo de extração clorofórmio-metanol / líquido / líquido (extração folch) com uma mistura da proporção 2:1 (v / v) [16]. Os compostos biologicamente abundantes de esfingolipídeos, isto é, esfingomielinas, foram analisados quantitativamente através da metodologia de injeção de fluxo de ionização ionosférica espectrometria de massa em tandem (FIA-ESI-MS / MS). A detecção de monitoramento de reações múltiplas (MRM) em forma positiva e negativa foi realizada utilizando equipamento SCIEX 4000 QTRAP® (SCIEX, Darmstadt, Alemanha). Os registros lipídicos descritos representam a soma do sinal de todos os lipídeos isobáricos com o mesmo peso molecular (intervalo de  $\pm 0,5$  Da) dentro da mesma classe lipídica

Cinco padrões internos foram utilizados para compensar os efeitos da matriz e 43 padrões para a calibração multiponto. A precisão das medições estava no intervalo normal para os métodos (desvios do alvo 20%) para todos

os analitos. As concentrações de cada metabolito da amostra foram determinadas em uma única análise e valores de concentração são dadas em  $\mu\text{M}$ . A análise quantitativa dos dados foi realizada utilizando o software interno MetIDQ™, permitindo a correção isotópica

### 3.5 Análise estatística

A análise estatística por PCA (análise de componentes principais) foi realizada a partir de uma matriz de dados construída com auxílio dos softwares MarkerLynx (Waters, Manchester, UK) e Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA), a partir dos valores de  $m/z$  e intensidade relativa dos íons observados no perfil, por MALDI. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada no software Pirouette 3.11 (Infometrics Inc, EUA).

As variáveis foram apresentadas em média e desvio padrão. Um teste  $t$  para amostras independentes foi realizado a fim de identificar alterações metabólicas significativas entre os grupos caso e controle. Os dados foram corrigidos para múltiplos testes usando o procedimento Benjamini-Hochberg (BH).

O Fold change (FC) foi avaliado através do cálculo da razão entre as médias dos valores de metabólitos dos grupos caso e controle ( $FC = \text{Caso} / \text{Controle}$ ). As diferenças de concentrações com 15% de diferença, sendo  $FC < 0,85$ , foram consideradas diminuídas e,  $FC > 1,15$ , foram consideradas aumentadas no grupo de caso em comparação com o grupo de controle.

O teste de normalidade foi aplicado a partir do Shapiro-Wilker. Metabólitos com valores de  $p$  inferiores a um nível de significância de  $\alpha = 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. O processamento de dados e análise estatística foi realizado a partir do software R (versão 3.2.3).

### **3.6 Aspectos Éticos**

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão/UFMA, sendo aprovado pelo Parecer de nº 1.318.564/2015 ( Apêndice I). Durante a pesquisa foram observados aspectos contidos na Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 466/12, que trata de pesquisas com seres humanos. Foi assinado o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) (Apêndice II) pela gestante, onde se deixou claro a possibilidade de não participar da pesquisa, dos benefícios que os resultados desta poderiam trazer para a população e se procurou garantir a privacidade durante a aplicação do questionário.

## SEGUNDA SEÇÃO

### 4. Capítulo 1 – Artigo 1

#### ARTIGO ORIGINAL

#### SPHINGOLIPIDS AND PREECLAMPSIA DEVELOPMENT IN PREGNANT WOMEN IN SÃO LUIS, MARANHÃO

Short Title: SPHINGOLIPIDS AND PREECLAMPSIA

Lorena Lauren Chaves Queiroz <sup>1&\*</sup>, Marcio Lee de Meneses Bezerra<sup>2&</sup>;  
Rosangela Maria Lopes Sousa<sup>3&</sup>; José Albuquerque de Figueiredo Neto<sup>3&</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão, Avenue of Portuguese 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil; Course of Nursing. State University of Maranhão, Cross Paulo VI Cidade Universitária, São Luís, Maranhão, Brazil.

<sup>2</sup> Federal University of Maranhão, Avenue of Portuguese 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil.

<sup>3</sup> <sup>1</sup>Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão, Avenue of Portuguese 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil

.

\*Corresponding author:

Email: [lorenalcq@yahoo.com.br](mailto:lorenalcq@yahoo.com.br)

&These authors also contributed to this work.



#### Author contributions

Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – Original Draft, LLCQ and JAFN; Writing – Review & Editing, JAFN.

#### Support:

Foundation for Scientific Research and Development of Maranhão (Publication of Support for the Publication of Articles)

#### Competing interests:

The authors have declared that no competing interests exist.

## **ABSTRACT**

### **Background**

Preeclampsia (PE) is a potentially fatal pregnancy disorder whose pathogenesis isn't completely understood. The origin of PE occurs very early in pregnancy, so many biophysical and biochemical markers have been proposed as preeclampsia predictors. This study aimed to evaluate the concentration of sphingolipids in the blood plasma of pregnant women with preeclampsia and ones without it.

### **Methods**

Case-control, performed from June to November 2016 on 20 pregnant women with Gestational preeclampsia (GPE) and 20 healthy pregnant women (CTL). Pregnant women 20 weeks pregnant or more were included. Socio-demographic and health data were collected, as well as a 10mL blood sample for lipid analysis from ionization-type Mass Spectrometry and laser desorption (MALDI-MS). The analysis was carried out with IBM SPSS Statistics 20 (2011),

using Chi-square Independence or Fisher's Exact, Shapiro Wilk test, and student t or even its non-parametric correspondent (Mann Whitney) at a 5% significance level.

## **Results**

There was no difference between the two groups regarding age, marital status, color, schooling, work or family income. An increase in plasma levels of sphingomyelins C18.0, C18. 1, C20. 2, C24.1, C26.0 and C26.1 was observed in patients with preeclampsia. After multivariate analysis and application of BH, the values were significant only for the metabolites SM C18: 0, SM C18: 1 and SM C26: 0.

## **Conclusions**

In this study, pregnant women with preeclampsia had an increase in sphingomyelins SM C18: 0, SM C18: 1 and SM C26: 0, which may be involved in the preeclampsia process. New studies are required for the confirmation of these data.

Keywords: Preeclampsia; Lipidomics; Sphingolipids; Mass Spectrometry; Brazil

## **INTRODUCTION**

Preeclampsia (PE) is a potentially fatal pregnancy disorder characterized by hypertension (140/90 mmHg) and proteinuria (300 mg/24 hours) after 20 weeks of pregnancy. Systematic PE complications aren't limited to the gestational period and studies have shown adverse outcomes such as:

increased risk of developing hypertension, ischemic heart disease, acute myocardial infarction venous thromboembolism, requiring greater continuation time and life-long monitoring of these patients. [1,2].

Despite its relevance, PE pathogenesis is not fully understood. Although there are known risk factors for the condition, it's still not possible to identify patients who will develop the syndrome [3].

PE mechanisms predominantly occur in pregnancy [4], which has motivated the search for predictive tests based on placental dysfunction, inflammatory response markers, coagulation system activation and endothelial injury among others [5,6,7]. Many biophysical and biochemical markers have been proposed as preeclampsia predictors [8].

Recently, sphingolipids and sphingolipid-related proteins have been implicated as potential factors involved in PE pathogenesis, and could be used to predict their early occurrence [9,10].

Different authors have demonstrated *in vitro* that sphingolipids are involved in the physiological process of trophoblastic differentiation and uterine angiogenesis, and that these mechanisms are altered in PE [11,12].

Lipidomics based on sphingolipid mass spectrometry (sphingolipidomics) has demonstrated a precise and sensitive technique for the discovery of disease biomarkers [13,14].

Different studies, using the lipidomic technique, have observed the increase of different sphingolipids in the plasma of pregnant women with preeclampsia, although other studies have not demonstrated this association [9,15].

This study aimed to evaluate the concentration of sphingolipids in the blood plasma of pregnant women with preeclampsia and ones without it.

## **METHODS**

This is a case-control study, carried out from June to November, 2016, in the Obstetrics Service - Specialized Pre-natal Maternity Unit, in the city of São Luís, Maranhão, in the northeastern region of Brazil. The study is part of the project called "Cardiovascular biomarkers in pregnant women with preeclampsia."

This project was submitted and approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Maranhão/UFMA, and was approved by ruling nº. 1.318.564/2015. During the research, aspects contained in National Health Council (CNS) Resolution no. 466/12 were observed.

### **Study population**

The population was comprised of women over 18 years old who were at least 20 weeks pregnant. The sample was divided into 2 groups: one "preeclampsia" group (n = 20), and another group without preeclampsia called "normal" (n = 20).

### **Sample collection and storage**

10ml blood samples were collected from the subjects. For blood collection, sample stabilization and transport were performed with the PAXgene Blood RNA Tubes (Qiagen, NL), according to the manufacturer's protocol.

Serum samples were processed for 20 minutes at room temperature (18 to 24° C, 22° C average) and centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm. The separated serum was distributed into cryotubes, which were frozen and stored in a freezer at -70° C, for dosage at the same time of all serum variables.

### **Lipidomic analysis**

A target metabolomic approach was applied using the lipid trial and was analyzed by the Biocrates Life Science AG laboratory (Innsbruck, Austria) according to standard internal protocol. Lipid classes were quantitatively quantitated in 40 human serum samples. To determine lipid metabolites, the Samples (serum) were centrifuged and the supernatant was used for analysis. Sample preparation of the 20 µL sample volume was followed by chloroform-methanol/liquid / liquid extraction protocol (folch extraction) with a 2:1 v / v [16]. Biologically abundant sphingolipid compounds, ie, sphingomyelins, were quantitatively analyzed by ion-flow ionization flow injection methodology in tandem mass spectrometry (FIA-ESI-MS / MS). Positive and negative multiple reaction monitoring (MRM) detection was performed using SCIEX 4000 QTRAP® equipment (SCIEX, Darmstadt, Germany). Lipid registers described represent the sum of the signal of all isobaric lipids of the same molecular weight (range of  $\pm 0.5$  Da) within the same lipid class

Five internal standards were used to compensate for matrix effects and 43 standards for multipoint calibration. Measurement accuracy was in the normal range for the methods (target deviations 20%) for all analytes. Concentrations of each metabolite of the sample were determined in a single

analysis and concentration values are given in  $\mu\text{M}$ . Quantitative data analysis was performed using the internal MetIDQ™ software, allowing the isotopic correction

### **Statistical analysis**

Statistical analysis by PCA (principal components analysis) was performed using a data matrix constructed with MarkerLynx software (Waters, Manchester, UK) and Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) and software Pirouette 3.11 (InfometricsInc, USA), from the values of m/z and relative ion intensity observed in the profile, by MALDI.

The variables were presented in average and standard deviation. A t-test for independent samples was performed in order to identify significant metabolic changes between case and control groups. Data was corrected for multiple tests using the Benjamini-Hochberg (BH) procedure.

Metabolites with p values lower than a significance level of  $\alpha = 0.05$  were considered as statistically significant. Statistical programs STATA12.0 and SAS 9.4 were used. To analyze the lipid data, the in-houseMetIdQ™ software from Biocrates Life Sciences AG was used to examine raw data and evaluate and export the data. Data was processed and analyzed statistically using R (Version 3.2.3).

## **RESULTS**

40 pregnant women (Control Group, n = 20 and Group PE, n = 20) were evaluated. There was no difference between the two groups regarding age, marital status, color, schooling, work or family income. (Table 1).

**Table 1. Socioeconomic data among pregnant women (Control Groups and Preeclampsia).São Luís, Maranhão, Brazil, 2019.**

Variables	Group				Total	p
	Control		Preeclampsia			
	n	%	n	%		
<b>Age group (years)</b>						
≤18	1	5,0	2	10,5	3	0,448
19-34	18	90,0	15	73,7	33	
≥35	1	5,0	3	15,8	4	
<b>Marital status</b>						
Married / Stableunion	17	85,0	18	89,5	35	0,632
Single	3	15,0	2	10,5	5	
<b>Color</b>						
White	6	30,0	4	21,1	10	0,072
Black	8	40,0	3	15,8	11	
Brown/Mixed	6	30,0	13	63,1	19	
<b>Schooling (years)</b>						
None	0	0,0	1	5,0	1	0,070
1to 7	1	5,0	4	20,1	5	
8to11	3	15,0	7	34,7	10	
12 ormore	16	80,0	8	40,2	24	
<b>Work</b>						
No	11	55,0	12	59,8	23	0,749
Yes	9	45,0	8	40,2	17	
<b>Famly income (R\$)</b>						
< 1 minimum salary	5	25,0	5	25,1	10	0,067
≥ 1 minimum salary	13	65,0	7	34,7	20	
No income	2	10,0	8	40,2	10	
<b>Total</b>	20	50,0	20	50,0	40	

\* p<0.05

An increase in plasma levels of sphingomyelins C18.0, C18. 1, C20. 2, C24.1, C26.0 and C26.1 was observed in patients with preeclampsia.(Table 2)

**Table 2. Sphingolipids in maternal plasma. (Control Groups and Preeclampsia). São Luís, Maranhão, Brazil, 2019.**

<b>Class</b>	<b>Metabolite</b>	<b>P value</b>
<b>Sphingomyelin</b>	SM.OH.C14.1	0,5437
	SM.OH.C16.1	0,2288
	SM.OH.C22.1	0,8665
	SM.OH.C22.2	0,4174
	SM.OH.C24.1	0,2949
	SM.C16.0	0,1264
	SM.C16.1	0,0657
	<b>SM.C18.0</b>	<b>0,0011*</b>
	<b>SM.C18.1</b>	<b>0,0025*</b>
	<b>SM.C20.2</b>	<b>0,0437*</b>
	SM.C22.3	0,1179
	SM.C24.0	0,6019
	<b>SM.C24.1</b>	<b>0,0111*</b>
	<b>SM.C26.0</b>	<b>0,0031*</b>
<b>SM.C26.1</b>	<b>0,0365*</b>	

\* p<0.05



After multivariate analysis and application of BH, values were only significant increased for SM C18.0, SM C18.1 and SM C26.0 metabolites, in patients with preeclampsia (Table 3).

**Table 3. Sphingolipids in maternal plasma and application of BH. (Control Groups and Preeclampsia). São Luís, Maranhão, Brazil, 2019.**

class	Metabolite	P value	P value (BH)*
Sphingomyelin	SM.OH.C14.1	0,5437	0,7197
	SM.OH.C16.1	0,2288	0,4512
	SM.OH.C22.1	0,8665	0,9047
	SM.OH.C22.2	0,4174	0,6062
	SM.OH.C24.1	0,2949	0,5205
	SM.C16.0	0,1264	0,3286
	SM.C16.1	0,0657	0,2457
	<b>SM.C18.0</b>	<b>0,0011</b>	<b>0,0249</b>
	<b>SM.C18.1</b>	<b>0,0025</b>	<b>0,0320</b>
	SM.C20.2	0,0437	0,2092
	SM.C22.3	0,1179	0,3221
	SM.C24.0	0,6019	0,7305
	SM.C24.1	0,0111	0,0844
	<b>SM.C26.0</b>	<b>0,0031</b>	<b>0,0337</b>
	SM.C26.1	0,0365	0,1884

\* Benjamini-Hochberg

\*  $p < 0.05$

## DISCUSSION

In this study, Sphingomyelin C18:0 SM, C18:1SM, and C26:0SM were increased in patients with Preeclampsia. This result is in line with other studies that have shown increased sphingolipid serum levels in patients with PE [3, 16].

New studies should guarantee the impact of these variables together with lipidomic analysis of pregnant women, since this variable should not be seen in isolation, but rather as a synergy of associated factors [9,10,13].

Lipidomics has applications in the discovery of potential lipid biomarkers for various metabolic diseases such as obesity, diabetes, cardiovascular disease and cancer, and the detection and identification of small and abundant lipid species in serum can elucidate specific functions or serve as potential disease-indicating biomarkers [17,18].

Sphingolipids, classically considered purely inert structural elements of the cell membrane, have been recognized as bioactive mediators and flags in the modulation of a variety of fundamental cellular processes [19].

This lipid group is built on a common sphingolipid base skeleton. In humans, this backbone is most commonly, but not exclusively, sphingoid (SPH), which is an 18-carbon amino acid alcohol with unsaturated hydrocarbon chain. Sphingoid bases can fuse with various ceramide-forming fatty acids (GCAA), the central point of hundreds of sphingolipids' biosynthesis. AGGCs serve as metabolic and structural precursors of complex sphingolipids such as Sphingomyelin (SM), the most abundant mammal sphingolipid, the role of each

individual sphingolipid is multidimensional in terms of subcellular localization and mechanism of action [20].

The accumulation of sphingolipids in a variety of cells and tissues characterizes several human disorders. In addition, the subcellular compartment in which the lipids are generated, the pathway involved in their synthesis and cell type, influences the role of sphingolipids in the disease [21].

Studies have shown that sphingolipids are also involved in the regulation of vascular tone via cross-talk with intrinsic vasoactive factors released by endothelium. A specific role was defined for sphingolipids in regulation of vasoconstriction and vasodilation in different types of blood vessels (22).

More recently, AGGC elevation in spontaneously hypertensive rats has been shown to lead to vasoconstriction due to increased thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) release, a molecule known to contract vascular smooth muscle. Interestingly, increased AGGC plasma levels have also been found in humans affected by essential hypertension. Thus, positive AGGC regulation may contribute to increased vascular tone and endothelial dysfunction, a known contributor to the observed PE hypertension [23,24].

It is known that in PE pathogenesis, abnormal trophoblast implantation played a decisive role in uterine spiral arteries, leading to placental ischemia and oxidative stress, which consequently results in cellular apoptosis, the release of placental factors (including inflammatory proteins) and an imbalance between pro and anti-angiogenic factors. Due to oxidative stress and apoptosis in pathology, it is assumed that sphingolipids may play a significant role in PE pathogenesis [2,15].

As in this article, Dobierzewska et al. [20] find similar results when comparing the intergestational profile of circulating sphingolipids in maternal plasma of preeclamptic versus normotensive pregnant women in a prospective cohort analyzed in the first, second and third gestational trimesters, it was observed that dihydrosphingosine-1 (DH-S1P) was significantly reduced in the serum of pregnant women in the second trimester with preeclampsia (PE) compared to the first trimester, and that this could contribute to the reduced endothelial barrier observed in PE.

We observed increased SM C18:0 levels in patients with preeclampsia, which is in accordance with previous reports describing elevated SM 18:0 plasma levels in preeclamptic patients when compared with control subjects [3].

Melland-Smith et al; [9] evaluated sphingolipid serum levels in 10 pregnant women with PE and 10 pregnant women without PE, and found that serum concentrations of C16, C18, C20 and C24 were significantly higher in patients with PE.

Charkiewicz et al. [25] studied 21 women between 25 ± 40 weeks' gestation with a diagnosis of preeclampsia and 36 women with uncomplicated pregnancies, a significant increase was observed in the concentration of eight sphingolipids in the plasma of pregnant women with preeclampsia compared to the control group: Sph ( $p = 0.0032$ ), S1P ( $p = 0.0289$ ), C20-Cer ( $p < 0.0001$ ), C18-1-Cer ( $p < 0.0001$ ), C16-Cer ( $p = 0.012$ ), C18: 1-Cer ( $p = 0.003$ ), C22-Cer ( $P = 0.0071$ ) and C24: 1-Cer ( $p = 0.0085$ ).

Zhao; Cheng, & Lin [13], observed an increase in SM-18: 0 levels, but not SM-16: 0, in the maternal plasma of preeclamptic pregnant women compared to the control group.

Although these studies have demonstrated the increase of different sphingolipids in the plasma of preeclamptic pregnant women, other evaluations have found different results.

Dobierzewska et al. [26] in a retrospective study, evaluated normal healthy pregnant women (n = 7) and preeclamptic patients (PE) (n = 7). The objective of this study was to characterize the metabolic profile of three major sphingolipids (sphingosine-1-phosphate, Sphingomyelin, and ceramides) in the plasma of preeclamptic pregnant women compared to the control group in the first, second and third trimesters of gestation

and to determine if preeclampsia would be associated with a different sphingolipid profile when compared to the control group, which could be a potential candidate as marker for preeclamptic development in the first trimester.

The most prominent sphingomyelin was SM 16:0, showing elevation in both groups during gestation, but with statistical significance only in the PE group (1st vs 2nd trimester of PE and 1st vs 3rd trimester of PE). When comparing patients with PE and control, SM 16:0 was significantly reduced in plasma in the 1st trimester of individuals with PE versus controls.

The other SM species analyzed were: SM 18:0, SM 18:1 and SM 24:0, which were the most frequent sphingomyelin sub-populations.

Plasma levels in the first trimester of SM 18:0 were also significantly lower in the PE group when compared with controls. However, SM 18:0 increased significantly during gestation in patients with PE, which did not occur in the control group. There were no statistically significant differences between

the PE and the control group regarding SM 18:1, but there was a significant increase in the PE group between the first and second trimester of pregnancy. The levels of SM 24:0 did not change significantly in either group or between groups throughout gestation [20].

In international scientific literature, there is not much research on sphingolipid plasma in preeclamptic women, and this is a very little studied topic. There are few national studies on this topic, and to our knowledge, this is the first study to describe major sphingolipid levels in preeclamptic patients' plasma and of normotensive pregnant women in our state.

In conclusion, preeclampsia is an important obstetric complication during pregnancy and one of the main causes of maternal and fetal morbidity and mortality. It is difficult to predict the clinical outcome due to the absence of early, sensitive and specific biochemical markers.

This study revealed three sphingolipids, SM C18:0, SM C18:1, and SM C26:0, which were increased in pregnant women with preeclampsia, which in the future, may serve as PE biomarkers, together with mass spectrometry-based lipidation, become part of the routine pre-natal diagnostic test at the beginning of the pregnancy. New studies are required for the confirmation of these data.

## Reference

- 1 Anand, S., Barnes, J. M., Young, S. A., Garcia, D. M., Tolley, H. D., Kauwe, J. S., & Graves, S. W. Discovery and confirmation of diagnostic serum lipid biomarkers for Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017;59(1), 277-290.

- 2 Enomoto, H., Y. Sugiura, M. Setou, N. Zaima. Visualization of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine and sphingomyelin in mouse tongue body by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;400(7):1913-21.
- 3 Korkeas, H. A., Sass, N., Moron, A. F., Câmara, N. O. S., Bonetti, T., Cerdeira, A. S., & De Oliveira, L. Lipidomic assessment of plasma and placenta of women with early-onset preeclampsia. *PLoS One*, 2014;9(10), e110747.
- 4 Dekker, G. A., & Sibai, B. M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1998;179(5), 1359-1375.
- 5 Conde-Agudelo, A., Romero, R., & Lindheimer, M. Chesley's Hypertensive Disorders of Pregnancy. Tests to predict preeclampsia, 2009;191.
- 6 SIBAI, B.M. Biomarker for hypertension–preeclampsia: are we close yet? *Am J ObstetGynecol*, v. 197, p. 1-2; 2007.
- 7 Wang, A., Rana, S., & Karumanchi, S. A. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology*, 2009;24(3), 147-158..
- 8 Baumann, M. U., Bersinger, N. A., & Surbek, D. V. Serum markers for predicting pre-eclampsia. *Molecular aspects of medicine*, 2007;28(2), 227-244.
- 9 Melland-Smith, M., Ermini, L., Chauvin, S., Craig-Barnes, H., Tagliaferro, A., Todros, T., ... & Caniggia, I. Disruption of sphingolipid metabolism augments ceramide-induced autophagy in preeclampsia. *Autophagy*, 2015;11(4), 653-669..
- 10 Dobierzewska, A., Palominos, M., Sanchez, M., Dyhr, M., Helgert, K., Venegas-Araneda, P., ... & Illanes, S. E. Impairment of angiogenic sphingosine kinase-1/sphingosine-1-phosphate receptors pathway in preeclampsia. *PloS one*, 2016;11(6), e0157221..
- 11 Singh, A. T., Dharmarajan, A., Aye, I. L., & Keelan, J. A. Ceramide biosynthesis and metabolism in trophoblast syncytialization. *Molecular and cellular endocrinology*, 2012;362(1-2), 48-59.
- 12 Singh, A. T., Dharmarajan, A., Aye, I. L., & Keelan, J. A. Sphingosine–sphingosine-1-phosphate pathway regulates trophoblast differentiation and syncytialization. *Reproductive biomedicine online*, 2012;24(2), 224-234.

- 13 Zhao, Y. Y., Cheng, X. L., & Lin, R. C. Lipidomics applications for discovering biomarkers of diseases in clinical chemistry. In *International review of cell and molecular biology*, 2014: 313, pp. 1-26). Academic Press.
- 14 Shevchenko, A., & Simons, K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2010:11(8), 593..
- 15 Ermini, L., Caniggia, I., Melland-Smith, M., & Post, M. Mass Spectrometry Imaging of Sphingolipids in Preeclamptic Placentae. *Placenta*, 2013:34(9), A10.
- 16 Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J biolChem*, 1957;226(1), 497-509.
- 17 Oliveira, A. C. M. D., Santos, A. A., Bezerra, A. R., Barros, A. M. R. D., & Tavares, M. C. M. Fatores maternos e resultados perinatais adversos em portadoras de pré-eclâmpsia em Maceió, Alagoas. *Arq Bras Cardiol [Internet]*, 2016;106(2), 113-20.
- 18 Hu, C., van der Heijden, R., Wang, M., van der Greef, J., Hankemeier, T., & Xu, G. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *Journal of Chromatography B*, 2009:877(26), 2836-2846.
- 19 Meikle, P. J., Wong, G., Barlow, C. K., & Kingwell, B. A. Lipidomics: potential role in risk prediction and therapeutic monitoring for diabetes and cardiovascular disease. *Pharmacology & therapeutics*, 2014:143(1), 12-23.
- 20 Dobierzewska, A., Soman, S., Illanes, S. E., & Morris, A. J. Plasma cross-gestational sphingolipidomic analyses reveal potential first trimester biomarkers of preeclampsia. *PloS one*, 2017:12(4), e0175118.
- 21 Aguilar, P. S., Fröhlich, F., Rehman, M., Shales, M., Ulitsky, I., Olivera-Couto, A., ... & Ejsing, C. S. A plasma-membrane E-MAP reveals links of the eisosome with sphingolipid metabolism and endosomal trafficking. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2010:17(7), 901.
- 22 Merrill Jr, A. H., Wang, E., Mullins, R. E., Jamison, W. C. L., Nimkar, S., & Liotta, D. C. Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 1988:171(2), 373-381.



- 23 Nikolova-Karakashian, M N.; Rozenova, Krassimira A. Ceramide in stress response. In: *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*. Springer, New York, NY, 2010. p. 86-108.
- 24 Roviezzo, F., Bucci, M., Delisle, C., Brancaleone, V., Di Lorenzo, A., Mayo, I. P., ... & Cirino, G. Essential requirement for sphingosine kinase activity in eNOS-dependent NO release and vasorelaxation. *The FASEB journal*, 2006;20(2), 340-342.
- 25 Spijkers, L. J., Alewijnse, A. E., & Peters, S. L. Sphingolipids and the orchestration of endothelium-derived vasoactive factors: when endothelial function demands greasing. *Molecules and cells*, 2010;29(2), 105-111.
- 26 Spijkers, L. J., van den Akker, R. F., Janssen, B. J., Debets, J. J., De Mey, J. G., Stroes, E. S., ... & Eijkel, G. B. Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: a potential role for ceramide. *PloS one*, 2011;6(7), e21817.
- 27 Charkiewicz, K., Goscik, J., Blachnio-Zabielska, A., Raba, G., Sakowicz, A., Kalinka, J., ... & Laudanski, P. Sphingolipids as a new factor in the pathomechanism of preeclampsia—Mass spectrometry analysis. *PloS one*, 2017;12(5), e0177601.

**5 Capítulo 2 – Artigo 2****ARTIGO ORIGINAL****AVALIAÇÃO LIPIDÔMICA DO PLASMA DE MULHERES COM E SEM PRÉ-ECLÂMPSIA****LIPIDOMIC EVALUATION OF PLASMA OF WOMEN WITH AND WITHOUT PRE-ECLAMPSIA**

Lorena Lauren Chaves Queiroz <sup>1,3\*</sup>, Márcio Lee de Meneses Bezerra<sup>2</sup>, Joana Katia<sup>1</sup> Veras Rodrigues Sampaio Nunes<sup>1</sup>, José Albuquerque de Figueiredo Neto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Estadual do Maranhão, Santa Inês, , Maranhão, Brasil

\* Autor para Correspondência:

Email: [lorenalcq@yahoo.com.br](mailto:lorenalcq@yahoo.com.br)

Conflito de Interesse:

Declara-se que não houve conflito de interesses

## RESUMO

**Introdução:** A Pré-Eclâmpsia (PE) é um distúrbio da gravidez potencialmente fatal, cuja patogênese não é completamente entendida. A origem da PE ocorre muito cedo na gravidez, por isso muitos marcadores biofísicos e bioquímicos têm sido propostos como preditores de pré-eclâmpsia. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar detalhadamente o perfil lipídico, a fim de identificar possíveis alterações, abrindo uma nova perspectiva para a compreensão dos distúrbios metabólicos vivenciados pelas gestantes com PE, usando uma abordagem lipidômica envolvendo espectrometria de massa. **Métodos e Resultados:** Analisou-se o perfil lipídico sérico em 40 grávidas com pré eclampsia e normais usando uma abordagem lipidômica e espectrometria de massa. Espécies lipídicas do tipo acilcarnitinas (C0, C3 e C5) apresentaram alterações significantes ( $p < 0,05$ ). Observou-se também que as lisofosfatidilcolinas (lysoPC a C20:4 e a lysoPC a C28:1) aparecem inicialmente dentre os metabólitos que apresentaram diferenças estatisticamente significantes, mas após a correção de múltiplos testes aplicando Benjamini-Hochberg (BH) essa significância não se manteve. Porém destaca-se que as lysoPC.a.C 16.1; 18.1; 20:4 e a 28:1 apresentaram concentrações aumentadas no grupos pré eclampsia. **Conclusão:** Este estudo detectou alterações lipídicas, especialmente em acilcarnitinas em gestantes com pré -eclampsia, bem como correlações com as lisofosfatidilcolinas, que poderão no futuro ser úteis na investigação de doenças associadas à pré eclampsia.

**Palavras-chave:** Pre Eclâmpsia. Lipidômica. Acilcarnitinas. Lisofosfatidilcolinas. Espectrometria de Massa

## INTRODUÇÃO

Os distúrbios hipertensivos são as complicações mais comuns no pré-natal, acometendo 12 a 22% das gestações, dentre eles a Pré eclampsia (PE) é uma das principais causas de óbito materno em países desenvolvidos e em desenvolvimento.<sup>1,2</sup> Seu diagnóstico baseia-se no desenvolvimento da hipertensão (140 /90 MmHg) e proteinúria significativa (300 mg / 24 horas) após 20 semanas de gestação.<sup>3,4</sup>

As complicações sistêmicas da PE não se limitam ao período gestacional e estudos recentes têm mostrado desfechos adversos, como

aumento do risco de desenvolver hipertensão, cardiopatia isquêmica, infarto agudo do miocárdio, tromboembolismo venoso, exigindo maior tempo de seguimento e vigilância desses pacientes ao longo da vida.<sup>5,6</sup>

Torna-se cada vez mais claro que a PE é causada por interações entre mecanismos fisiopatológicos complexos, genes individuais e fatores ambientais, e ainda que algumas características da fisiopatologia da PE já tenham sido elucidadas, a sua patogênese ainda não foi claramente estabelecida.<sup>7</sup>

Os métodos clássicos de análise, por sua vez, apresentam limitações e, diante do número de pessoas com doenças metabólicas, há necessidade de análises lipídicas mais detalhadas. É, portanto, imperativo que novas ferramentas e metodologias sejam buscadas tanto para fins diagnósticos quanto para o monitoramento da eficiência terapêutica prescrita, a fim de possibilitar o controle e tratamento mais adequado da doença e, conseqüentemente, preservar a vida.<sup>8</sup>

A abordagem Lipidômica integrado com outras abordagens “ômicas”, incluindo metabolômica, proteômica e genômica, é capaz de identificar e quantificar vários metabólitos de moléculas endógenas dentro de um sistema biológico e tem sido usado com sucesso para identificar perfis metabólicos associados a atividades biológicas, estado fisiológico e doenças.<sup>9</sup>

Estudos que são relevantes para o tema já foram publicados, como Alshehry et al<sup>10</sup>, que encontraram que esfingolipídios, fosfolipídios, ésteres de colesterol e glicerolipídeos estavam associados a eventos cardiovasculares futuros e morte cardiovascular em pessoas com diabetes mellitus tipo 2 . Estudo realizado por Nogueira; da Cruz , Fontenele ; Figueiredo Neto<sup>8</sup> detectou alterações lipídicas, especialmente em ceramidas, pós-menopausa, bem como correlações com marcadores glicídicos e lipídicos em mulheres na menopausa e De Oliveira et al.<sup>11</sup> e Korkes et al<sup>6</sup>, identificaram alguns lipídeos em maior abundância no plasma de gestantes em pré-eclâmpsia.

O objetivo deste estudo foi avaliar detalhadamente o perfil lipídico, a fim de identificar possíveis alterações, abrindo uma nova perspectiva para a compreensão dos distúrbios metabólicos vivenciados pelas gestantes com PE, usando uma abordagem lipidômica envolvendo espectrometria de massa.

## **METODOS**

Trata-se de um estudo caso-controle, realizado no período de junho a novembro de 2016, no Serviço de Obstetrícia – Pré-Natal Especializado de uma Maternidade, no

município de São Luís, Maranhão, na região nordeste do Brasil. O estudo é parte do Projeto chamado “Biomarcadores cardiovasculares em gestantes com pré-eclâmpsia”.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão/UFMA, sendo aprovado pelo Parecer de nº 1.318.564/2015. Durante a pesquisa foram observados aspectos contidos na Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 466/12.

### **População do estudo**

Composta por gestantes com faixa etária superior a 18 anos e idade gestacional igual ou superior a 20 semanas. A amostra foi dividida em 2 grupos: um grupo “pré-eclâmpsia” (n = 20), outro grupo sem pré –eclampsia denominado "normais" (n = 20).

### **Coleta e armazenamento das amostras**

Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue dos sujeitos de pesquisa. Para coleta de sangue, estabilização e transporte das amostras foi realizada com o kit PAXgene Sangue RNA Tubos (Qiagen, NL), segundo o protocolo da empresa fabricante.

O processamento das amostras sanguíneas para extração do soro foi realizado com a manutenção destas por 20 minutos em temperatura ambiente (18 a 24° C, média de 22° C) e posterior centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm. O soro separado foi distribuído em criotubos, que foram congelados e

estocados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para dosagem em um mesmo momento de todas as variáveis séricas

### **Análise lipidômica**

Uma abordagem metabolômica alvo foi aplicada utilizando o ensaio lipídico foram analisadas pelo laboratório *Biocrates Life Science AG* (Innsbruck, Áustria), de acordo com o protocolo padrão interno. As classes lipídicas foram analisadas quantitativamente em 40 amostras de soro humano. Para determinar os metabólitos lipídicos, as amostras (soro) foram centrifugadas e o sobrenadante foi usado para análise. A preparação da amostra do volume da amostra de  $20\mu\text{L}$  foi seguida por protocolo de extração clorofórmio-metanol / líquido / líquido (extração folch) com uma mistura de uma proporção 2: 1 (v / v) (Folch; Stanley, 1957). Os compostos biologicamente abundantes de esfingolipídios, isto é, esfingomielinas, foram analisados quantitativamente através da metodologia de injeção de fluxo de ionização ionosférica espectrometria de massa em tandem (FIA-ESI-MS / MS). A detecção de monitoramento de reações múltiplas (MRM) em forma positiva e negativa foi realizada utilizando equipamento SCIEX 4000 QTRAP® (SCIEX, Darmstadt, Alemanha). Os registros lipídicos descritos representam a soma do sinal de todos os lípidos isobáricos com o mesmo peso molecular (intervalo de  $\pm 0,5$  Da) dentro do mesma classe lipídica

Cinco padrões internos foram utilizados para compensar os efeitos da matriz e 43 padrões para a calibração multiponto. A precisão das medições estava no intervalo normal para os métodos (desvios do alvo 20%) para todos os analitos. As concentrações de cada metabólito da amostra foram determinadas em uma única análise e valores de concentração são dadas em  $\mu\text{M}$ . A análise quantitativa dos dados foi realizada utilizando o software interno MetIDQ™, permitindo a correção isotópica

## **Análise estatística**

As variáveis quantitativas são apresentadas como média e desvio padrão, o teste t foi utilizado para identificar as diferenças significativas entre os grupos e o coeficiente de Pearson (r) para avaliar a correlação entre as variáveis, com valores de  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo.

Os programas estatísticos STATA 12.0 e SAS 9.4 foram utilizados. Para analisar os dados lipidômicos, o software in-house MetIdQTM da Biocrates Life Sciences AG foi usado para examinar os dados brutos e avaliar e exportar os dados. Os dados foram processados e analisados estatisticamente usando R (Versão 3.2.3). Os dados brutos foram limpos para excluir os analitos com valores de concentração faltando ou abaixo do limite de detecção (LOD). Os dados foram posteriormente transformados em  $\log_2$ . A dobra (FC) foi calculada pela razão entre as médias dos metabólitos gestantes com Pre eclampsia (caso) e gestantes “normais” (controle) ( $FC = \text{Caso} / \text{Controle}$ ). A taxa de descoberta falsa (FDR) foi calculada usando o teste de Benjamini-Hochberg (BH) também foi calculada. As diferenças foram consideradas notáveis quando a variância analítica foi maior que 25% entre os grupos; isto é,  $FC > 1,15$  ou  $FC < 0,85$ , de modo que foi considerado como uma concentração alterada na Pre Eclampsia em relação às normais.<sup>12</sup>

## **RESULTADOS**

Foram avaliadas 40 gestantes (Grupo Controle,  $n=20$  e Grupo PE,  $n=20$ ). Em ambos os grupos prevaleceram, respectivamente, gestantes com: 19 a 34 anos casada ou em união estável. Quanto a cor da pele, no Grupo Controle prevaleceram negras e no Grupo PE, mulheres parda ou mulatas. Em ambos os grupos as gestantes apresentaram 12 anos ou mais de estudo, não possuíam emprego. Já em relação à renda, o Grupo Controle despontou renda superior a um salário mínimo e no Grupo PE, indicaram em maior proporção não possuírem renda própria,  $p > 0,05$  (Tabela 1).

**Tabela 1. Dados socioeconômicos entre gestantes (Grupos Controle e Pré-Eclâmpsia). São Luís, Maranhão, Brasil, 2019.**

Variáveis	Grupo				Total	P
	Controle		Pré-eclâmpsia			
	n	%	n	%		
<b>Faixa etária (anos)</b>						
≤18	1	5,0	2	10,5	3	
19-34	18	90,0	15	73,7	33	0,448
≥35	1	5,0	3	15,8	4	
<b>Estado civil</b>						
Casada / União estável	17	85,0	18	89,5	35	0,632
Solteira	3	15,0	2	10,5	5	
<b>Cor</b>						
Branca	6	30,0	4	21,1	10	
Negra	8	40,0	3	15,8	11	0,072
Parda/Mulata	6	30,0	13	63,1	19	
<b>Escolaridade (anos)</b>						
Nenhuma	0	0,0	1	5,0	1	
1 a 7	1	5,0	4	20,1	5	0,070
8 a 11	3	15,0	7	34,7	10	
12 ou mais	16	80,0	8	40,2	24	
<b>Trabalho</b>						



Não	11	55,0	12	59,8	23	0,749
Sim	9	45,0	8	40,2	17	
<b>Renda Familiar (R\$)</b>						
< 1 salário mínimo	5	25,0	5	25,1	10	0,067
≥ 1 salário mínimo	13	65,0	7	34,7	20	
Sem renda	2	10,0	8	40,2	10	
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>50,0</b>	<b>20</b>	<b>50,0</b>	<b>40</b>	

Os metabolitos significativamente alterados foram classes de metabólitos das acilcarnitinas, e lisofosfatidilcolinas. A identificação dos diferentes lipídios encontrados foi realizada através do Lipid Database Search (<http://www.lipidmaps.org>).

Observa-se que dentre as acilcarnitinas, 06 metabolitos apresentaram valores significativos ( $p < 0,05$ ): C0, C14.1, C14.2, C3, C4 e C5. Depois de correção de múltiplos testes aplicando o procedimento de Benjamini-Hochberg (BH), 03 metabolitos foram encontrados estatisticamente significantes, C0, C3 e C5 (Tabela 2).

**Tabela 2. Dados de concentração das Acilcarnitinas entre gestantes (Grupos Controle e Pré-Eclâmpsia). São Luís, Maranhão, Brasil, 2019.**

	Metabólito	Pvalor*	Pvalor* ( BH <sup>1</sup> )
Acilcarnitinas	C0	<b>0,0010</b>	<b>0,0249*</b>
	C10	0,0599	0,2457
	C14.1	<b>0,0458</b>	0,2099
	C14.2	<b>0,0138</b>	0,0874
	C16	0,0934	0,2823
	C18	0,2552	0,4784
	C18.1	0,0883	0,2823
	C18.2	0,0516	0,2221
	C2	0,6266	0,7353
	C3	<b>0,0048</b>	<b>0,0483*</b>
	C3.DC..C4.OH.	0,3368	0,5536
	C4	<b>0,0107</b>	0,0844
	C5	<b>0,0027</b>	<b>0,0320*</b>

<sup>1</sup> Benjamini-Hochberg  
\*p<0.05

Destaca-se que as lisofosfatidilcolinas lysoPC.a.C20:4 e a lysoPC.a.C28:1 aparecem inicialmente dentre os metabólitos que apresentaram diferenças estatisticamente significantes, mas após a correção de múltiplos testes aplicando (BH) essa significância não se manteve. Porém destaca-se que as lysoPC.a.C 16:1; 18:1; 20:4 e a 28:1 apresentaram concentrações aumentadas no grupos pre eclampsia ( Tabela 3).

**Tabela 3: Valores de alteração da dobra (FC), referentes à diferença entre as concentrações de lipídios entre gestantes (Grupos Controle e Pré-Eclâmpsia). São Luís, Maranhão, Brasil, 2019.**

Classe	Metabolito	P valor	P valor (BH)	FC caso/Controle
<b>Lyso-PCs</b>	lysoPC.a.C16.0	0,5877	0,7197	1,08
	<b>lysoPC.a.C16.1</b>	0,5879	0,7197	<b>1,18</b>
	lysoPC.a.C17.0	0,6667	0,7697	1,10
	lysoPC.a.C18.0	0,5694	0,7197	1,09
	<b>lysoPC.a.C18.1</b>	0,2440	0,4745	<b>1,20</b>
	lysoPC.a.C18.2	0,7723	0,8501	0,98
	lysoPC.a.C20.3	0,3598	0,5741	1,11
	<b>lysoPC.a.C20.4</b>	<b>0,0371*</b>	0,1884	<b>1,42</b>
	lysoPC.a.C26.0	0,7549	0,8375	1,00
	lysoPC.a.C26.1	0,5488	0,7197	1,00
	<b>lysoPC.a.C28.0</b>	<b>0,0442*</b>	0,2092	<b>1,27</b>
	lysoPC.a.C28.1	0,2969	0,5205	1,08

FC =Foldchange

\* p<0.05

## DISCUSSAO

Neste estudo, gestantes com pré-eclâmpsia prevaleceram: com companheiros, possuíam cor da pele parda ou mulata, 12 anos ou mais de estudo, viviam sem emprego ou renda própria.

Oliveira et al.<sup>2</sup>, ao avaliarem os fatores maternos e os resultados perinatais adversos em uma coorte de gestantes com pré-eclâmpsia da rede pública de saúde de Maceió (Alagoas, Brasil), em estudo de coorte prospectivo com 90 gestantes com pré-eclâmpsia, observaram resultados semelhantes quanto a idade materna, escolaridade, estado civil: onde 73,3% das gestantes avaliadas, tiveram entre 20 e 34 anos, 56,7% tiveram 4 anos ou mais de estudo, 57,8% possuíam um companheiro e 70% recebiam um salário mínimo ou mais. Diferentemente dos dados desta pesquisa, os autores relataram que apenas 16,7% eram negras.

Novos estudos devem garantir o impacto destas variáveis conjuntamente a análise lipídômica de gestantes, pois esta variável, não deve ser vista de forma isolada e sim, como uma sinergia de fatores associados.

Novos conhecimentos surgiram utilizando novas metodologias, em especial estudos de metabólômica, estes estudos forneceram informações sobre metabólitos chave envolvidos no DMG e Pre- eclampsia (aminoácidos, lisofosfatidilcolina e acilcarnitinas.<sup>13-16</sup>

A carnitina desempenha um papel indispensável no metabolismo de ácidos graxos, sendo essencial para o transporte de ácidos gordurosos sobre as membranas mitocondriais interna e externa para a mitocôndria, onde ocorre a  $\beta$ -oxidação. Além disso, possui um papel na remoção de metabólitos tóxicos em excesso, por exemplo, grupos acilo, que são excretados como acilcarnitinas pelos rins.<sup>17</sup>

No plasma, a maioria da carnitina esterificada está presente como acetilcarnitina. O número total de ésteres de carnitina no plasma é referido como acilcarnitina.<sup>18</sup>

A análise de carnitina plasmática é uma importante ferramenta de diagnóstico para reconhecer deficiências na oxidação de ácidos graxos. Estudos demonstram que as concentrações plasmáticas de carnitina diminuem durante a gravidez normal. A importância da carnitina na oxidação de ácidos gordos durante a depleção de energia de tecido, combinada com as menores concentrações plasmáticas de carnitina durante a gravidez, sugere que o metabolismo anormal dos ácidos graxos na pré-eclâmpsia está associada a um aumento da concentração plasmática de carnitina.<sup>19,20</sup>

No estudo de Thiele; Niezen-Koning; Van Gennip; Aarnoudse,<sup>18</sup> encontrou que, no grupo pré-eclâmpsia, as concentrações plasmáticas de carnitina aumentaram aproximadamente 50% em comparação com o grupo controle.

Neste estudo ao serem avaliadas as concentrações dos metabólitos lipídicos identificados pela lipidômica, foi observado um aumento significativo na concentração plasmática de Acilcarnitina C0, C3 e C5 nas pacientes do grupo PE.

Estudos em gestações normais mostram uma diminuição na carnitina livre (C0) do plasma e nos níveis totais de carnitina, sendo a queda mais acentuada durante a primeira metade da gravidez. No momento da administração, os níveis plasmáticos de carnitina plasmática são aproximadamente metade dos observados em mulheres não grávidas.<sup>6,18</sup>

Por outro lado, já se sabe que no soro de gestantes com pré-eclâmpsia, bem como dos seus filhos, encontrava-se elevada a concentração plasmática de carnitina e as acilcarnitinas, respectivamente, e que a função mitocondrial placentária está prejudicada e associa-se à fisiopatologia da hemólise, elevação das enzimas hepáticas e baixa contagem de plaquetas, além da pré-eclâmpsia.<sup>21</sup>

Obido et al.<sup>22</sup>, avaliaram 41 pacientes com pré-eclâmpsia e 41 gestantes sem pré-eclâmpsia, observaram aumento dos metabólitos hydroxyisovalerylcarnitine e hydroxyhexanoylcarnitine (C5OH e C6OH), nas pacientes com pré-eclâmpsia.

Koster et al.<sup>23</sup>, ao expandir o estudo dos biomarcadores lipidomicos da PE através da análise de acilcarnitinas em plasma materno, em estudo caso-controle com gestantes entre 8 e 14 semanas de idade gestacional, reforça que a estearoilcarnitina pode ser considerado um novo biomarcador metabolômico para pré-eclâmpsia precoce ou tardia, mesmo que ainda não sejam adequados para implementação clínica devido a seus altos custos. O considerável aumento das concentrações plasmáticas de carnitina, em associação com o acúmulo de lipídios, alicerçam o papel do metabolismo lipídico anormal na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, sugerindo que metabólitos tóxicos resultantes da oxidação anormal de ácidos graxos na placenta, podem contribuir para a disfunção endotelial na pré-eclâmpsia.

Os achados deste estudo somam-se aos de outros estudos, associando às anormalidades do metabolismo lipídico, incluindo o metabolismo dos ácidos graxos, e a carnitina, a fisiopatologia da PE.

De acordo com Baig et al<sup>24</sup>, o nível de lisofosfatidilcolinas proporciona um método simples, preciso e minimamente invasivo para detectar a pré-eclâmpsia precocemente em gravidezes. Geralmente, os métodos da invenção compreendem a obtenção de um espécime de uma paciente grávida, ensaiando a amostra para determinar o nível de compostos de glicerofosfatidilo (GPX), glicerofosfatidilcolina (GPC), lisofosfolípidos (LPX) e / ou lisofosfatidilcolina (LPC) na amostra, e comparando o nível medido com níveis normais de pacientes sem pré-eclâmpsia. Níveis inferiores ao normal de GPX, GPC, LPX e / ou LPC sinalizam a existência de uma condição para a ocorrência da pré-eclâmpsia no paciente. Dependendo do tipo de espécime e procedimento de preparação empregado, o nível particular de GPX, GPC, LPX e / ou LPC indicativo de pré-eclâmpsia pode variar.

Em estudo realizado por Anand et al<sup>4</sup> encontrou-se, os níveis mais elevados desses marcadores em casos de pré-eclâmpsia, isso pode ser explicado devido ao fato da isquemia placentária e a apoptose serem frequentemente relatadas na pré-eclâmpsia, resultando em lise celular com liberação de componentes da membrana, incluindo prováveis fosfatidilcolinas, na circulação.

Numa forma de realização alternativa da presente invenção, um indivíduo é testado repetidamente ao longo do tempo para monitorizar quaisquer alterações significativas. Uma mudança significativa, como uma diminuição das concentrações GPX, GPC, LPX ou LPC em comparação com os níveis anteriores em uma amostra do paciente, pode sinalizar o início da pré-eclâmpsia ou a deterioração da condição pré-eclítica. Em contraste, os aumentos nos níveis de GPX, GPC, LPX ou LPC mais próximos dos níveis normais podem indicar uma melhoria na condição.<sup>21</sup>.

Assim, a expressão lipídica diferenciada na pré-eclâmpsia encontrada neste estudo, pode implicar em modulação negativa da resposta imune, coagulação, estresse oxidativo e apoptose.<sup>24</sup>

Por outro lado, Korkes et al.<sup>6</sup>, ao caracterizar o perfil lipídico na placenta e no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia, observaram que o lipídeo mais

prevalente presente no plasma das gestantes com pré-eclâmpsia foi a classe Glicerofosfoerinas-GP03 (PS) com 52,30% da composição lipídica total e Glicerofosfoetanolaminas-GP02 (PEt) com 24,03%. Comparativamente ao grupo controle, amostras de plasma do Grupo Pré-eclâmpsia demonstraram aumento da PS ( $p < 0,0001$ ) e PC ( $p < 0,0001$ ).

Anand et al.<sup>3</sup>, também ressaltam que biomarcadores lipidômicos séricos parecem ser capazes de identificar boa parte das gestantes com risco de pré-eclâmpsia em uma gravidez por volta da 12<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semanas gestacionais.

A diferença entre a divergência de resultados com a literatura pode implicar que outros fatores podem estar envolvidos na patogênese da Pré-Eclâmpsia, pois o agravo é multifatorial e heterogêneo, com muitos fatores envolvidos, sendo a formação da placenta prejudicada, bem como remodelamento vascular e a adaptação imunológica<sup>23</sup>. Além disso, outras condicionantes podem estar envolvidas, como variáveis socioeconômicas, biológicas, idade gestacional, estado nutricional pré-gravídico, estado psicossomáticas, entre outras<sup>11</sup>.

## **CONCLUSÃO**

Apesar de uma amostra limitada, este estudo utilizou-se de testes estatísticos apropriados e obteve parcialmente resultados semelhantes aos já descritos na literatura.

Gestantes com pré-eclâmpsia demonstraram perfil lipidômico com elevação das Acilcarnitinas C0, C3 e C5. Destaca-se que as lysoPC.a.C 16:1; 18:1; 20:4 e a 28:1 apresentaram probabilidades aumentadas no grupos pre eclampsia, o que pode estar associado ao processo de instalação da pré-eclâmpsia. Este estudo detectou alterações lipídicas, especialmente em acilcarnitinas em gestantes com pre -eclampsia, bem como correlações com as lisofosfatidilcolinas, que poderão no futuro ser úteis na investigação de doenças associadas à pre eclampsia.

## REFERÊNCIAS

1. Moura, ER, Oliveira, CG, Damasceno, AK, Quintino Pereira, M. Fatores de risco para síndrome hipertensiva específica da gestação entre mulheres hospitalizadas com pré-eclâmpsia. *Cogitare Enfermagem*. 2010;15(2):250-255.
2. Oliveira, A. C. M. D., Santos, A. A., Bezerra, A. R., Barros, A. M. R. D., & Tavares, M. C. M. Fatores maternos e resultados perinatais adversos em portadoras de pré-eclâmpsia em Maceió, Alagoas. *Arq Bras Cardiol [Internet]*, 2016;106(2), 113-20.
3. Anand, S., Young, S. A., Esplin, S. M., Peadar, B., Tolley, H. D., Porter, T. F., ... & Graves, S. W. Detection and confirmation of serum lipid biomarkers for preeclampsia using direct infusion mass spectrometry. *Journal of lipid research*, 2016;jlr-P064451.
4. Enomoto, H., Y. Sugiura, M. Setou, N. Zaima. Visualization of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine and sphingomyelin in mouse tongue body by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal.Bioanal. Chem*. 2011;400(7):1913-21.
5. Townsend R, O'Brien P, Khalil A. Current best practice in the management of hypertensive disorders in pregnancy. *Integr Blood Press Control*. 2016;9:79-94. Published 2016 Jul 27. doi:10.2147/IBPC.S77344
6. Korkes, H. A., Sass, N., Moron, A. F., Câmara, N. O. S., Bonetti, T., Cerdeira, A. S., ...& De Oliveira, L. Lipidomic assessment of plasma and placenta of women with early-onset preeclampsia. *PLoS One*, 2014;9(10), e110747
7. Kahhale S, Francisco R, Zugaib M. Pré-eclâmpsia. *revistadc [Internet]*. 15jun.2018 ;97(2):226-34.
8. Nogueira IAL, da Cruz ÉJSN, Fontenele AMM, Figueiredo Neto JAd (2018) Alterations in postmenopausal plasmatic lipidome. *PLoS ONE* 13(9): e0203027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203027>
9. Quehenberger, O; Dennis, E. A.The human plasma lipidome. *New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 19, p. 1812-1823; 2011.
10. Alshehry ZH, Mundra PA, Barlow CK, Mellett NA, Wong G, McConville MJ, et al. Plasma lipidomic profiles improve upon traditional risk factors for the prediction of cardiovascular events in type 2 diabetes. *Circulation*. 2016;
11. Oliveira L, Camara NO, Bonetti T, Lo Turco EG, Bertolla RP, Moron AF, et al. Lipid fingerprinting in women with early-onset preeclampsia: a first look. *Clin Biochem*, 2012. 45: 852–55. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.04.012> PMID: 22548912



12. Tulipani S, Rodriguez MP, Alonso AM, Cardona F, Ramell AM, Zonja B, et al. Biomarkers of Morbid Obesity and Prediabetes by Metabolomic Profiling of Human Discordant Phenotypes. *Clinica Chimica Acta*. 2016; 463 53–61
13. Subki AH, Algethami MR, Baabdullah WM, et al. Prevalence, Risk Factors, and Fetal and Maternal Outcomes of Hypertensive Disorders of Pregnancy: A Retrospective Study in Western Saudi Arabia. *Oman Med J*. 2018;33(5):409-415.
14. Gupta, N., Gupta, T. & Asthana, D. *J Obstet Gynecol India* (2017) 67: 258. <https://doi.org/10.1007/s13224-016-0958-z>
15. Rana S, Karumanchi S.A, Lindheimer M.D. Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in preeclampsia. *Hypertension*. v. 6, p. 198–202; 2014.
16. Anand, S., Barnes, J. M., Young, S. A., Garcia, D. M., Tolley, H. D.,Kauwe, J. S., & Graves, S. W. Discovery and confirmation of diagnostic serum lipid biomarkers for Alzheimer’s disease using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Alzheimer'sDisease*, 2017;59(1), 277-290.
17. Vaz F.M, Wanders R. J. Carnitine biosynthesis in mammals. *BiochemJ*: n. 361, p.417–29; 2002.
18. Thiele, I. G., Niezen-Koning, K. E., van Gennip, A. H., &Aarnoudse, J. G. Increased plasma carnitine concentrations in preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*, 2004;103(5), 876-880.
19. Hu, C., van der Heijden, R., Wang, M., van der Greef, J., Hankemeier, T., & Xu, G. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *Journal of Chromatography B*, 2009:877(26), 2836-2846.
20. Koumantakis E, sifakis S, koumantaki Y, Hassan E, Matalliotakis I, Ppadopoulou E, et al. Plasma carnitine levels of pregnant adolescents in labor. *J PediatrAdolesc Gynecol*. v. 14, p. 65–69; 2001.
21. Illsinger, S., Janzen, N., Sander, S., Schmidt, K. H., Bednarczyk, J., Mallunat, L., ...& Hass, R. Preeclampsia and HELLP syndrome: impaired mitochondrial function in umbilical endothelial cells. *Reproductive Sciences*, 2010;17(3), 219-226.
22. Odibo, A. O., Goetzinger, K. R., Odibo, L., Cahill, A. G., Macones, G. A., Nelson, D. M., &Dietzen, D. J. First-trimester prediction of preeclampsia using metabolomic biomarkers: a discovery phase study. *Prenataldiagnosis*, 2011:31(10), 990-994.

23. Koster, M. P., Vreeken, R. J., Harms, A. C., Dane, A. D., Kuc, S., Schielen, P. C., ... & Pennings, J. L. First-trimester serum acylcarnitine levels to predict preeclampsia: a metabolomics approach. *Disease markers*, 2015.
24. Baig, S., Lim, J. Y., Fernandis, A. Z., Wenk, M. R., Kale, A., Su, L. L., ... & Choolani, M. Lipidomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*, 2013;34(5), 436-442.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pré-eclâmpsia é uma importante complicação obstétrica durante a gravidez e uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna e fetal. É difícil prever o desfecho clínico devido à ausência de marcadores bioquímicos precoces, sensíveis e específicos.

Apesar de uma amostra limitada, este estudo utilizou-se de testes estatísticos apropriados e obteve parcialmente resultados semelhantes aos já descritos na literatura, na análise geral das características das participantes observou-se que estas apresentavam diferenças significativas em marcadores lipídicos. Este estudo revelou três esfingolípidos, SM C18: 0, SM C18: 1 e SM C26.0, que foram aumentados em mulheres grávidas com pré-eclâmpsia, que no futuro, podem servir como biomarcadores de PE. Observou-se ainda que gestantes com pré-eclâmpsia demonstraram perfil lipidômico com elevação das Acilcarnitinas C0, C3 e C5. Destaca-se que as lysoPC.a.C 16.1; 18.1; 20:4 e a 28:1 apresentaram probabilidades aumentadas no grupo pre eclampsia, o que pode estar associado ao processo de instalação da pré-eclâmpsia.

Este estudo detectou alterações lipídicas, especialmente em esfingomielinas e acilcarnitinas em gestantes com pre -eclampsia, bem como correlações com as lisofosfatidilcolinas, que poderão no futuro ser úteis na investigação de doenças associadas à pre eclampsia. É necessário a realização de novos estudos necessários para a confirmação desses dados.

## REFERÊNCIAS

AAGAARD-TILLERY K.M, BELFORT M.A. Eclampsia: morbidity, mortality and management. **Clinical Obstetrics Gynecology**, v.58, n.1, p.12- 23, 2005.

AGUILAR, P. S., FRÖHLICH, F., REHMAN, M., SHALES, M., ULITSKY, I., OLIVERA-COUTO, A., & EJSING, C. S. A plasma-membrane E-MAP reveals links of the eisosome with sphingolipid metabolism and endosomal trafficking. **Nature Structural and Molecular Biology**, 17(7), 901, 2010.

ALSHEHRY ZH, MUNDRA PA, BARLOW CK, MELLETT NA, WONG G, MCCONVILLE MJ, et al. Plasma lipidomic profiles improve upon traditional risk factors for the prediction of cardiovascular events in type 2 diabetes. **Circulation**. 2016;

ALVAREZ, J. J., et al. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. **J Lipid Res**, v. 37, n. 2, p. 299-308, 1996.

AMORIM M.M.R, KATZ L, ÁVILA M.B, ARAÚJO D.E, VALENÇA M, ALBUQUERQUE C.J.M, et al. Perfil das admissões em uma unidade de terapia intensiva obstétrica de uma maternidade brasileira. **Revista Brasileira Saúde Materno Infantil**, v.1, p. 55-62, 2006.

AMORIM M.M.R, KATZ L, VALENÇA M, ARAÚJO D.E. Morbidade materna grave em UTI obstétrica no Recife, região nordeste do Brasil. **Revista Associação Medicina Brasileira**, v.54, n.3, p. 261-6, 2008.

ANAND, S. et. al. Detection and confirmation of serum lipid biomarkers for preeclampsia using direct infusion mass spectrometry. **Journal of lipid research**, v. 57, n. 4, p. 687-696; 2016.

ANAND, S., BARNES, J. M., YOUNG, S. A., GARCIA, D. M., TOLLEY, H. D.,KAUWE, J. S., & GRAVES, S. W. Discovery and confirmation of diagnostic serum lipid biomarkers for Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. **Journal of Alzheimer's Disease**, 59(1), 277-290, 2017.

ARCK, P. C. e HECHER, K. Hecher. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. **Nat Med**, v. 19, n. 5, p. 548-556, 2013.

AURO K, JOENSUU K, FISHER K, KETTUNEN J, et al. A metabolic view on menopause and ageing. **Nature Communications**. N.5, p.470-8, 2014.

AUSTDAL M, TANGERAS L.H, SKRASTAD R.B, SALVESEN K, AUGUSTGULEN R, IVERSEN A-C, BATHEN T.F: First Trimester Urine and Serum Metabolomics for Prediction of Preeclampsia and Gestational

Hypertension: A Prospective Screening Study. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, n. 9, p. 21520-21538; 2015.

BAIG, S., LIM, J. Y., FERNANDIS, A. Z., WENK, M. R., KALE, A., SU, L. L., .&CHOOANI, M. Lipidomic analysis of human placental syncytiotrophoblastmicrovesicles in adverse pregnancy outcomes. **Placenta**, 34(5),436-442, 2013.

BAKER, A. H. e DELLES, C. Is microRNA-376c a biomarker or mediator of preeclampsia? **Hypertension**, v. 61, p. 4, p. 767-769, 2013.

BAKKER R, STEEGERS E.A.P, HOFMAN A, JADDOE V.W.V. Blood Pressure in Different Gestational Trimesters, Fetal Growth, and the Risk of Adverse Birth Outcomes. **American Journal of Epidemiology**, v.174, p797-806, 2011.

BALTA, S., et al. Endocan--A Novel Inflammatory Indicator in Newly Diagnosed Patients With Hypertension: A Pilot Study. **Angiology**, 2014.

BAUMANN A.U. BERSINGER, N.A.; SURBEK, D.V. Serum markers for predicting pre-eclampsia. **Molecular aspects medicine**, v. 28(2), p. 277-244, 2007.

BERGAMO A.C; ZEIGER B.B; VIDAL D.H. B, et al. The epidemiology of preeclampsia in a reference hospital. **Pregnancy Hypertension**; v.5, n. 1, p. 114, 2015.

BEZERRA EHM, ALENCAR JÚNIOR CA, FEITOSA RFG, CARVALHO AAA. Maternal mortality due to hypertension: rate and analysis of its characteristics in a teaching maternity hospital. **Rev Bras Ginecol Obstet**.27 (9):548-53. 2005.

BORZYCHOWSKI A.M, SARGENT IL, REDMAN C.W. Inflammation and pre-eclampsia. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v.11, p.309-16, 2006.  
BRASIL. Ministério da Saúde. **Gestação de Alto Risco: Manual Técnico**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Mulher** : Princípios e Diretrizes / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – 1. ed., 2. reimpr. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, p. 82 : il. – (Série C. Projetos, Programas e Relatórios), 2011.

BROUGHTON PIPKIN, F. Maternal Physiology. In: EDMONDS, D. K. Dewhurst's textbook of **obstetrics & Gynecology**. London: Wiley-Blackwell, p. 5-15. 2012.

BROWN MA. Pre-eclampsia: proteinuria in pre-eclampsia - does it matter any more? **Nat Rev Nephrol** ,8(10):563-5, 2012.

BROWN, N. J. Aldosterone and vascular inflammation. **Hypertension**, Dallas, v. 51, n. 2, p. 161-7, Jan. 2008.

BRYSON C.L, IOANNOU G.N, RULYAK S.J, CRITCHLOW C.  
Association between gestational diabetes and pregnancy-induced hypertension. **American Journal of Epidemiology**, n.158, p.1148 – 53, 2003.

CABRAL, A. C. V. et al. Aspectos Atuais da Fisiopatologia da Pre-eclâmpsia com Repercussões na Conduta. **Femina**, Rio de Janeiro, v.37, n. 6, p. 305-308, 2009.

CAVALLI R.C, SANDRIM V.C, SANTOS J.E.T, DUARTE G. Predição de pré-eclâmpsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n.1, p. 1-4, 2009.

CHAPPELL, L. C., et al. Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected preeclampsia: a prospective multicenter study. **Circulation**, v. 128, n. 19, p. 2121-2131, 2013

CHARKIEWICZ et al., "Sphingolipids as a new factor in the pathomechanism of preeclampsia -Mass spectrometry analysis," (in eng), **PLoS One**, vol. 12, no. 5, p. e0177601, 2017

CONDE- AGUDELO A, BELIZANJM. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. **BJOG**.v.107. n.75, p.83; 2000.

CONDE-AGUDELO A, ALTHABE F, BELIZAN J.M, KAFURY-GOETA A.C.  
Cigarette smoking during pregnancy and risk of pre-eclampsia: a systematic review. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.181, p.1026-35, 1999.

COSTA A.A.R, RIBAS M.S.S.S, AMORIM M.M.R, SANTOS L.C. Mortalidade materna na cidade do Recife. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.24, n.7, p. 455-62, 2002.

COZZI, V., et al. PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR. **Placenta**, v. 33, n. 12, p. 1039-1044, 2012.

CUNHA C.C; CAMPOS D. F; BARBOZA E. Uso da busca ativa de óbitos na avaliação do Sistema de Informações sobre Mortalidade em Minas Gerais, Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 275-286, 2011.

DEEVSKA, G.M, SUNKARA, M, MORRIS A. J, NIKOLOVA-KARAKASHIAN M. N. Characterization of secretory sphingomyelinase activity, lipoprotein sphingolipid content and LDL aggregation in *ldlr*<sup>-/-</sup> mice fed on a high-fat diet. **Bioscience reports**, v. 32, n. 5, p. 479-490; 2012.

DEKKER, G. A., & SIBAI, B. M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. **American journal of obstetrics and gynecology**, 179(5), p.1359-1375, 1998.

DEKKER, G.; SIBAI, B. Primary, secondary, and tertiary prevention of preeclampsia. **Lancet, London**, v. 357, n. 9251 p. 209-215, 2001.

DESOYE, G., GAUSTER, M., WADSACK, C. Placental transport in pregnancy pathologies. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 6 Suppl, p. 1896-1902, 2011.

DOBIERZEWSKA, A., PALOMINOS, M., SANCHEZ, M., DYHR, M., HELGERT, K., VENEGAS-ARANEDA, P., ... & ILLANES, S. E. Impairment of angiogenic sphingosine kinase-1/sphingosine-1-phosphate receptors pathway in preeclampsia. **PloS one**, 11(6), 2016.

DOBIERZEWSKA, A., SOMAN, S., ILLANES, S. E., & MORRIS, A. J. Plasma cross-gestational sphingolipidomic analyses reveal potential first trimester biomarkers of preeclampsia. **PloS one**, 12(4), 2017.

DONG N, ZHOU T, ZHANG Y, LIU M, LI H, HUANG X, WU Q. Corin mutations K317E and S472G from preeclamptic patients alert zymogen activation and cell surface targeting. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17909-17916; 2014.

DULEY, L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. **Semin Perinatol**, v. 33, n. 3, p. 130-137, 2009.

EKROOS, K et al. Lipidomics: a tool for studies of atherosclerosis. **Current atherosclerosis reports**, v. 12, n. 4, p. 273-281; 2010.

ENNEN, C.S., & SATIN, A.J. Training and assessment in obstetrics: The role of simulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, 2010. 24,747758. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2010.03.003

ENOMOTO, H., Y. SUGIURA, M. SETOU, N. ZAIMA. Visualization of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine and sphingomyelin in mouse tongue body by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** 400(7), p.1913-21, 2016.

ERMINI, L., CANIGGIA, I., MELLAND-SMITH, M., & POST, M. Mass Spectrometry Imaging of Sphingolipids in Preeclamptic Placentae. **Placenta**, 34(9), A10.2013.

FAHY, E.; COTTER, D.; SUD, M.; Subramaniam, S. Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. **Lipids** 2011, 1811, 637-647, 2011.

FOLCH, J., LEES, M., & SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J biolChem**, 226(1), p.497-509, 1957.

FOLK, QAM "Hypertensive Disorders of Pregnancy: Overview and Current Recommendations," (in eng), **J Midwifery Womens Health**, vol. 63, no. 3, pp. 289-300, 2018

FREITAS, F. **Rotinas em Obstetrícia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 904p.2011.

GAIO DS, SCHMIDT MI, DUNCAN BB, NUCCI LB, MATOS MC, BRANCHTEIN L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. **Hypertens Pregnancy**.n.20, p.269-81,2011.

GALÃO, A. O., et al. L-arginine erythrocyte transport increases during pregnancy and immediately postpartum. **Am J Obstet Gynecol**, v. 191, n. 2, p. 572-575, 2004.

GALEWSKA Z, ROMANOWICZ L, JAWORSKI S, BANKOWISKI E. Matrix metalloproteinases, MMP-7 and MMP-26, in plasma and serum of control and preeclamptic umbilical cord blood. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 150, n. 2, p. 152-156; 2010.

GARDOSI J. Customised assessment of fetal growth potential: implications for perinatal care. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 97, n. 5, p. F314-317, 2012.

GHOSH, S. K., et al. Is serum placental growth factor more effective as a biomarker in predicting early onset preeclampsia in early second trimester than in first trimester of pregnancy? **Arch Gynecol Obstet**, v. 287, n. 5, p. 865-873, 2013.

GHOSH, S. K., et al. Serum PLGF as a potential biomarker for predicting the onset of preeclampsia. **Arch Gynecol Obstet**, v. 285, n. 2, p. 417-422, 2012.

GHULMIYYAH, L. e SIBAI, B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. **Semin Perinatol**, v. 36, n. 1, p. 56-59, 2012

GOLDMAN e AUSIELLO. Cecil, **Tratado de medicina interna**. Ed. 22º Elsevier, 2005.

GONZALEZ-COVARRUBIAS V. Lipidomics in longevity and healthy aging. **Biogerontology**. 2013.

GUPTA, N., GUPTA, T. & ASTHANA, D. **J Obstet Gynecol India**, 67: 258. 2017. <https://doi.org/10.1007/s13224-016-0958-z> , 2017.

HAHN S, GUPTA A.K, TROEGER C, RUSTERHOLZ C, HOLZGREVE W: Disturbances in placental immunology: ready for therapeutic interventions? **Springer Seminars in Immunopathology**, v.27, p.477-93, 2006.

HAMMOUD A.O, BUJOLD E, SOROKIN Y, SCHILD C, KRAPP M, BAUMANN P. Smoking in pregnancy revisited: findings from a large population-based study **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.192, p.1856-62,2005

HAVULINNA AS; .. et al. Circulating ceramides predict cardiovascular outcomes in the population – based FINRISK 2002 cohort. *Arterioscler Tromb Vasc Bio.* 36, 2016.

HENTSCHKE MR, LUCAS LS, MISTRY HD, PINHEIRO DA COSTA BE, POLI-DE-FIGUEIREDO CE. Endocan-1 concentrations in maternal and fetal plasma and placenta in pre-eclampsia in the third trimester of pregnancy. *Cytokine*.n. 74, p.152–156, 2015

HU C, VAN DER HEIJDEN R, WANG M, VAN DER GREEF J, HANKEMEIER T, XU G. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *Journal of Chromatography B.* v. 877, n. 26, p 2663-2936; 2009.

HUPPERTZ B: The feto-maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. *Springer Seminars in Immunopathology*, v.29, p.83-94, 2007.

ILLSINGER, S., JANZEN, N., SANDER, S., SCHMIDT, K. H., BEDNARCZYK, J., MALLUNAT, L., & HASS, R. Preeclampsia and HELLP syndrome: impaired mitochondrial function in umbilical endothelial cells. *Reproductive Sciences*, 17(3), p.219-226, 2011.

JAIRAJPURI, D.S., & JAIRAJPURI, D.S. MicroRNA expression pattern in pre-eclampsia (Review). *Molecular Medicine Reports*,v.13, p. 2351-58, 2016.

JANNOTTI C.B, SILVA K.S, PERILLO R.D. Vulnerabilidade social e mortalidade materna no mundo e no Brasil. In: Bittencourt SDA, Dias MAB, Wakimoto MD (Org.) **Vigilância do óbito materno, infantil e fetal e atuação em comitês de mortalidade**. Rio de Janeiro, EAD/Ensp, p. 51-59, 2013.

JAUNIAUX E, POSTON L, BURTON G. J.Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Human Reproduction Update*, v.12, p.747-755, 2006.

JUNIOR, M. D. C. Fisiopatologia da Pré-eclâmpsia: aspectos atuais. *Femina*, v. 37, n. 5, p. 247-253, 2009

KAHHALE S, FRANCISCO R, ZUGAIB M. Pré-eclampsia. *Revistadc*, 97(2), p. 226-34, 2018

KARUMANCHI, S. A. et al. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol. Cel*,7,p.811–822 , 2001.

KATZ L, AMORIM M.M.R, MIRANDA G.V, SILVA J.L.P. Perfil clínico, laboratorial e complicações de pacientes com síndrome HELLP admitidas em uma unidade de terapia intensiva obstétrica. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.30, n.2, p. 80-6, 2008.



KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biology of reproduction**, New York, v. 69, n. 1, p. 1-7, 2003.

KE C, HOU Y, ZHANG H, YANG K, et al. Plasma metabolic profiles in women are menopause dependent. **Plos one** ,10 (11), 2015.

KHAN, K. S., et al. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. **Lancet**, v. 367, n. 9516, p. 1066-1074, 2006.

KONIECZNY, A., et al. Podocytes in urine, a novel biomarker of preeclampsia? **Adv Clin Exp Med**, v. 22, n. 2, p. 145, 2013.

KORKES, H. A., SASS, N., MORON, A. F., CÂMARA, N. O. S., BONETTI, T., CERDEIRA, A. S., & DE OLIVEIRA, L. Lipidomic assessment of plasma and placenta of women with early-onset preeclampsia. **PLoS One**, 9(10), 2014.

KOSTER, M. P., VREEKEN, R. J., HARMS, A. C., DANE, A. D., KUC, S., SCHIELEN, P. C., ... & PENNING, J. L. First-trimester serum acylcarnitine levels to predict preeclampsia: a metabolomics approach. **Disease markers**, 2015.

KOUMANTAKIS E, SIFAKIS S, KOUMANTAKI Y, HASSAN E, MATALLIOTAKIS I, PPADOPOULOU E, et al. Plasma carnitine levels of pregnant adolescents in labor. **J Pediatr Adolesc Gynecol**. v. 14, p. 65–69; 2001.

KUC, S., et al. Evaluation of 7 serum biomarkers and uterine artery Doppler ultrasound for first-trimester prediction of preeclampsia: a systematic review. **Obstet Gynecol Surv**, v. 66, n. 4, p. 225-239, 2011.

LAMARCA, B. The role of immune activation in contributing to vascular dysfunction and the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. **Minerva Ginecol**, v. 62, n. 2, p. 105-120, 2010

LANGMANN, T., et al. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 257, n. 1, p. 29-33, 1999.

LAPAIRE, O., et al. Microarray screening for novel preeclampsia biomarker candidates. **Fetal Diagn Ther**, v. 31, n. 3, p. 147-153, 2012.

LAURENTI R, JORGE M.H.P.M, GOTLIEB S.L.D. A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativa de um fator de ajuste. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.4, p.449-60, 2004.

LIMA, V. J., et al. Serum lipid levels in pregnancies complicated by preeclampsia. *Sao Paulo Med J*. v. 129, n. 2, p.73-6, 2011.

- LINDHEIMER M, ROBERTS J, CUNNINGHAM F. Test to predicts preeclampsia. In: **Chesle'y Hypertensive Disorders in pregnancy**. Third edition. cap 11, pg. 198, 2009.
- MARTINS-COSTA, S. H. **Doença Hipertensiva na Gravidez**. In: FREITAS, F. Rotinas em Obstetrícia. Porto Alegre: Artmed,. p.523-552. 2011.
- MAYNARD, S. E., et al. Gestational angiogenic biomarker patterns in high risk preeclampsia groups. **Am J Obstet Gynecol**, v. 209, n. 1, p. 1-9, 2013.
- MEADS, C. A. et al. Methods of prediction and prevention of pre-eclampsia: systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modeling. **Health Technology Assessment, Winchester**, v.12, n.6, p. 1-270, 2008.
- MEIKLE P. J.W, GERARD, B.C.K, KINGWELL B. A. Lipidomics: Potential role in risk prediction and therapeutic monitoring for diabetes and cardiovascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**. v.143, n.1, p. 1-11; 2014.
- MELLAND-SMITH M, ERMINI L, CHAUVIN S, CRAIG-BARNES H, TAGLIAFERRO A, TODROS T, POST M, CANIGGIA I. Disruption of sphingolipid metabolism augments ceramide-induced autophagy in preeclampsia. **Autophagy**, v. 11, n. 4, p. 653-669, 2015.
- MERRILL JR, A. H., WANG, E., MULLINS, R. E., JAMISON, W. C. L., NIMKAR, S., & LIOTTA, D. C. Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. **Analytical biochemistry**, 171(2), p. 373-381, 1988.
- MISTRY, H. D., et al. Novel expression and regulation of voltage-dependent potassium channels in placentas from women with preeclampsia. **Hypertension**, v. 58, n. 3, p 497-504, 2011.
- MOL, B.W., ROBERTS, C.T., THANGARATINAM, S., MAGEE, L.A., DE GROOT, C.J., AND HOFMEYR, G.J. Pre-eclampsia. **Lancet**. 2015.
- MOURA, ER, SANTOS DE OLIVEIRA, CG, DE CASTRO DAMASCENO, AK, QUINTINO PEREIRA, M. Fatores de risco para síndrome hipertensiva específica da gestação entre mulheres hospitalizadas com pré-eclâmpsia. **Cogitare Enfermagem**. 15(2), p.250-255, 2010.
- MUNDRA PA, BARLOW CK, MELLETT NA, WONG G, MCCONVILLE MJ, ET AL. Plasma lipidomic profiles improve upon traditional risk factors for the prediction of cardiovascular events in type 2 diabetes. **Circulation**. 2016.
- NASCIMENTO, T. L. C.; BOCARDI, B.M.I. ; ROSA, M. P. R. S. Doença Hipertensiva Específica na Gravidez (DHEG) em Adolescentes: Uma Revisão de Literatura. **Ideias e Inovações**, v. 2, p. 69-76, 2015.

NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY - NHBPEPWG. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 83, n. 1, p. 1689-1712, July, 2000.

NICHOLSON, JK; LINDON JC. Systems biology: metabolomics. **Nature**. 455, p.721-6, 2008.

NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M N.; ROZENOVA, KRASSIMIRA A. Ceramide in stress response. In: Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules. **Springer, New York, NY**, p. 86-108, 2010.

NOGUEIRA IAL, DA CRUZ ÉJSN, FONTENELE AMM, FIGUEIREDO NETO JAD .Alterations in postmenopausal plasmatic lipidome. **PLoS ONE** 13(9):, 2018. e0203027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203027>

ODIBO, A. O., GOETZINGER, K. R., ODIBO, L., CAHILL, A. G., MACONES, G. A., NELSON, D. M., &DIETZEN, D. J. First-trimester prediction of preeclampsia using metabolomic biomarkers: a discovery phase study. *Prenatdiagnosis*, 31(10),p. 990-994, 2011.

OLIVEIRA L, CAMARA NO, BONETTI T, LO TURCO EG, BERTOLLA RP, MORON AF, ET AL. Lipid fingerprinting in women with early-onset preeclampsia: a first look. **Clin Biochem**, 2012. 45: 852–55. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.04.012> PMID: 22548912.

OLIVEIRA, A. C. M. D., SANTOS, A. A., BEZERRA, A. R., BARROS, A. M. R. D., & TAVARES, M. C. M. Fatores maternos e resultados perinatais adversos em portadoras de pré-eclâmpsia em Maceió, Alagoas. **Arq Bras Cardiol** 106(2), p.113-20, 2016.

PAPANTONIOU, N., et al. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. **Prenat Diagn**, p. 1-6, 2013.

PECKS, U., et al. Maternal and fetal cord blood lipids in intrauterine growth restriction. **J Perinat Med**, v. 40, n. 3, p. 287- 296, 2012.

PHIPPS, D. PRASANNA, W. BRIMA, AND B. JIM, "Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines," (in eng), **Clin J Am Soc Nephrol**, vol. 11, no. 6, pp. 1102-13, 2016.

QUEHENBERGER, O; DENNIS, E. A. The human plasma lipidome. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 19, p. 1812-1823; 2011.

RANA S, KARUMANCHI S.A, LINDHEIMER M.D. Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in preeclampsia. **Hypertension**. v. 6, p. 198–202; 2014.

REDMAN CW, SACKS GP, SARGENT IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** 180:p. 499-50, 1999.

REDMAN, C. W. e SARGENT, I. L. Immunology of pre-eclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 6, p. 534-543, 2010.

REDMAN, C. W. Hypertension in pregnancy: the NICE guidelines. **Heart**, v. 97, n. 23, p. 1967-1969, 2011.

REZENDE, J de; MONTENEGRO, C A. Barbosa. **Obstetrícia Fundamental**. 12. ed. GUANABARA KOOGAN, 2013.1300p

ROCHA FA, LOPES J, PEREIRA AP, PINTO F. Tratamento da HTA na grávida - abordagem atual. **Revista Portuguesa de Hipertensão e Risco Cardiovascular**.39:p.12–13, 2014.

RODIE VA, FREEMAN DJ, SATTAR N, GREER I. Pre-eclampsia and cardiovascular disease: metabolic syndrome of pregnancy? **Atherosclerosis**, 175:p.189-202, 2004.

ROMERO P. J. Disfunción endotelial en la preeclampsia. **AnFacMed**. v.64. n.1, p. 43-54; 2003.

ROVIEZZO, F., BUCCI, M., DELISLE, C., BRANCALEONE, V., DI LORENZO, A., MAYO, I. P., & CIRINO, G. Essential requirement for sphingosine kinase activity in eNOS-dependent NO release and vasorelaxation. **The FASEB Journal**, 20(2), p. 340-342, 2006.

SAFTLAS A. F., OLSON D. R., FRANKS A. L., ATRASH H. K., POKRAS R. Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979–1986. **Am. J. Obstet. Gynecol**. 163, p. 460–465, 1990.

SCHWUDKE, A. SHEVCHENKO, N. HOFFMANN, AND R. AHRENDTS, "Lipidomics informatics for lifescience," (in eng), **J Biotechnol**, vol. 261, pp. 131-136, 2017.

SHEKHAWAT P, BENNETT M. J, SADOVSKY Y, NELSON D. M, RAKHEJA D, STRAUSS A.W. Human placenta metabolizes fatty acids: implications for fetal fatty acid oxidation disorders and maternal liver diseases. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**. v. 284, n. 6, p. 1098-1105; 2003.

SHEVCHENKO, A., & SIMONS, K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. **Nature reviews Molecular cell biology**, 11(8), p.593, 2010.

SIBAI, B. M.. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. **Obstetrics and Gynecology, Hagerstown**, v. 102, n. 1, p. 181-192, 2003.

- SIBAI, B. M.; DEKKER, G. A.; KUPFERMINC, M. Preeclampsia. **Lancet, London**, v. 365, n. 9461, p. 785-799, 2005.
- SIBAI, B. M.; STELLA, C. L. Diagnosis and management of atypical preeclampsia/eclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology, Saint Louis**, v. 200, n. 5, p. 481, 2009.
- SIBAI, B.M. Biomarker for hypertension–preeclampsia: are we close yet? **Am J Obstet Gynecol**, v. 197, p. 1-2; 2007.
- SIBAI, B.M. GORDON T, THOM E, CARITIS S.N, KLEBANOFF M, McNELLIS D, et. al., Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. **Am J Obstet Gynecol**. v. 172, p. 642-8; 1995.
- SINGH A.T, DHARMARAJAN A, AYE I. L, KEELAN J. A. Sphingosine–sphingosine-1-phosphate pathway regulates trophoblast differentiation and syncytialization. **Reproductive biomedicine online**, v. 24, n. 2, p. 224-234, 2012.
- SINGH, A. T., DHARMARAJAN, A., AYE, I. L., & KEELAN, J. A. Sphingosine–sphingosine-1-phosphate pathway regulates trophoblast differentiation and syncytialization. **Reproductive biomedicine online**, 24 (2), p. 224-234, 2012.
- SMITH, J. J. S. W. M. C. Hypertensive Disorders. Dewhurst's textbook of **Obstetrics & Gynaecology**., p.101-110, 2012.
- SOARES, L F. et al . Hemoglobinas variantes em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do estado do Piauí (Hemopi): conhecendo o perfil epidemiológico para construir a rede de assistência. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo , v. 31, n. 6, p. 471-472, 2009.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras Cardiol**; v.95, n.1, supl.1, p.1-51, 2017
- SPIJKERS, L. J., ALEWIJNSE, A. E., & PETERS, S. L. Sphingolipids and the orchestration of endothelium-derived vasoactive factors: when endothelial function demands greasing. **Molecules and cells**, 29(2), p. 105-111, 2010.
- SPIJKERS, L. J., VAN DEN AKKER, R. F., JANSSEN, B. J., DEBETS, J. J., DE MEY, J. G., STROES, E. S., & EIJKEL, G. B. Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: a potential role for ceramide. **PloS one**, 6(7), 2011.
- STAFF AC, BENTON SJ, VON DADELSZEN P, ROBERTS JM, TAYLOR RN, POWERS RW, ET AL. Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. **Hypertension**, 61(5) p. 932-42, 2013.
- SUBKI AH, ALGETHAMI MR, BAABDULLAH WM, ET AL. Prevalence, Risk Factors, and Fetal and Maternal Outcomes of Hypertensive Disorders of

Pregnancy: A Retrospective Study in Western Saudi Arabia. **Oman Med J.** 33(5), p.409-415, 2018.

THADHANI R, SOLOMON C.G; Preeclampsia — A Glimpse into the Future? **N Engl J Med**, v. 359, p. 858-860; 2008.

THIELE I.G, NIEZEN-KONING K. E, VAN GENNIP A. H, AARNOUDSE J. G. Increased plasma carnitine concentrations in preeclampsia. **Obstetrics & Gynecology**, v. 103, n. 5, (1) p. 876-880; 2004

THOMAS, A. et al. Mass spectrometry for the evaluation of cardiovascular diseases based on proteomics and lipidomics. **Thrombosis and haemostasis**, v. 106, n. 1, p. 20-33; 2011.

TIMALSINA, P. GYAWALI, AND A. BHATTARAI, "Comparison of lipid profile parameters and oxidized low-density lipoprotein between normal and preeclamptic pregnancies in a tertiary care hospital in Nepal," (in eng), **Int J Womens Health**, vol. 8, pp. 627-631, 2016

TOBINAGA, C. M., et al. Angiogenic factors and uterine Doppler velocimetry in early and late-onset preeclampsia, **Acta Obstet Gynecol Scand.**, 2014 doi: 10.1111/aogs.12366

TOWNSEND R, O'BRIEN P, KHALIL A. Current best practice in the management of hypertensive disorders in pregnancy. **Integr Blood Press Control.** 2016;9:79-94., 2016. doi:10.2147/IBPC.S77344

TRANQUILLI AL, DEKKER G, MAGEE L, ROBERTS J, SIBAI BM, STEYN W, ZEEMAN GG, BROWN MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. **Pregnancy Hypertension.**4(2), p.97-104, 2014.

TULIPANI S, RODRIGUEZ MP, ALONSO AM, CARDONA F, RAMELL AM, ZONJA B, ET AL. Biomarkers of Morbid Obesity and Prediabetes by Metabolomic Profiling of Human Discordant Phenotypes. **Clinica Chimica Acta.** 463, p. 53–61, 2016.

TURGUT et al., "Serum levels of the adipokines, free fatty acids, and oxidative stress markers in obese and non-obese preeclamptic patients," (in eng), **Clin Exp Obstet Gynecol**, vol. 42, no. 4, pp. 473-9, 2015.

TURNER AND A. B. HAMEED, "Hypertensive Disorders in Pregnancy Current Practice Review," (in eng), **Curr Hypertens Rev**, vol. 13, no. 2, p. 80-88, 2017

VAZ F.M, WANDERS R. J. Carnitine biosynthesis in mammals. **Biochem J:** n. 361, p.417–29; 2002.

VENKATESHA, S. et al Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nat Med.**, v. 12, n. 6, p.642-649, Epub 2006.

- VIANA RC, NOVAES MRCG, CALDERON IMP Mortalidade materna - uma abordagem atualizada. **Com Ciências Saúde**. 22:141, p.52-7, 2011.
- VIEIRA, M. C., et al. Flow-mediated dilatation of brachial artery as marker of preeclampsia morbidity. **Int J Cardiol**, 2013.
- VITOLO, M.R. **Nutrição: da gestação ao envelhecimento**. Ed. Rubio, 2008.
- WANG, A.; RANA, S.; KARUMANCHI, A.S. Preeclampsia: The role of angiogenic factors in its pathogenesis. **Physiology**, v. 24, p. 147-158, 2009.
- WEBER, M. A., et al. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community a statement by the american society of hypertension and the international society of hypertension. **J Hypertens**, v. 32, n. 1, p. 3-15, 2014.
- WENK M. R; Lipidomics: new tools and applications. **Cell**. v.143. n.6, p.888-895; 2010.
- WHO. Trends in Maternal Mortality: 1990 to 2008. Geneva: **WORLD HEALTH ORGANIZATION**, 2010. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500265\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500265_eng.pdf)>.
- WRIGHT, M. L., et al. Validation of DNA methylation patterns: potential biomarker for heritable risk of preeclampsia. **West J Nurs Res**, n. 34, v. 8, p. 1074-1075, 2012
- XIA, Y. and KELLEMS, R. E. Receptor-activating autoantibodies and disease: preeclampsia and beyond. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 7, n. 5, p. 659 -674, 2011.
- XIA, Y. e KELLEMS. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond. **Circ Res**, v. 113, n. 1, p. 78-87, 2013
- XIAO, J. P., et al. The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the severity and onset of preeclampsia. **Cytokine**, v. 60, n. 3, p. 856-860, 2012
- YOUNG, B.C., LEVINE, R.J. & KARUMANCHI, S.A. *Pathogenesis of preeclampsia*. **Annu. Rev. Pathol.** 5, p. 173–192, 2010.

## **ANEXOS**



**Anexo 1 – Termo de Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**






**Anexo 2** – Submissão: Revista Plos One

## Anexo 3 – Submissão Cadernos Saúde Pública

O novo artigo foi submetido com sucesso!

[Login: lorencq](#) [Português](#) [English](#) [Español](#)



**SAGAS**  
Sistema de Avaliação e Gerenciamento de Artigos  
Cadernos de Saúde Pública / Reports in Public Health

[Início](#) [Autor](#) [Editor](#) [Mensagens](#) [Sair](#)

---

### CSP\_0069/19

Arquivos	<a href="#">Versão 1</a> [Resumo]
Seção	Artigo
Data de submissão	13 de Janeiro de 2019
Título	Avaliação lipídômica do plasma de mulheres com e sem pré-eclâmpsia
Título corrido	Avaliação lipídômica do plasma de mulheres com e sem pré-eclâmpsia
Área de Concentração	Planejamento de Saúde
Palavras-chave	Pre Eclâmpsia, Lipidômica, Acilcarnitinas, Lisofosfatidilcolinas, Espectometria de Massa
Fonte de Financiamento	Nenhum
Conflito de Interesse	Nenhum
Condições éticas e legais	No caso de artigos que envolvem pesquisas com seres humanos, foram cumpridos os princípios contidos na <a href="#">Declaração de Helsinki</a> , além de atendida a legislação específica do país no qual a pesquisa foi realizada. No caso de pesquisa envolvendo animais da fauna silvestre e/ou cobaias foram atendidas as legislações pertinentes.
Registro Ensaio Clínico	Nenhum
Sugestão de consultores	Nenhum

[Lorencq Lorencq Oliveira \(Universidade Estadual de Marabá\)](#) [llorenz@uema.br](#)

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**TÍTULO DO PROJETO: BIOMARCADORES LIPÍDICOS SÉRICOS PREDITIVOS  
PARA PRÉ-ECLÂMPSIA**

**EQUIPE EXECUTORA:** Prof. Dr. José Albuquerque de Figueiredo Neto; Lorena  
Lauren Chaves Queiroz

Você está sendo convidada a participar como voluntária em uma pesquisa. Você será esclarecida sobre algumas informações a seguir, e caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias (uma para você e outra para o pesquisador responsável). Em caso de recusa, você não será penalizada de forma alguma. Caso tenha dúvidas, peça ajuda ao entrevistador (pesquisador).

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

Você está sendo convidada a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar alterações em exames específicos que serão realizados após coleta de sangue. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este e sua participação é importante como portadora de Doença Hipertensiva Específica da Gestação (DHEG). Este estudo é importante para ampliar o conhecimento sobre a DHEG, permitindo melhorar o tratamento, detectar lesões precocemente e permitir maior sobrevida para a mãe e o bebê.

Caso você concorde em participar, deverá responder a uma entrevista contendo dados de identificação, habitação, econômicos, sociais, antropométricos (peso, altura, etc.), hábitos de vida e uso de medicamentos. Sua pressão arterial será medida. Será feita uma coleta de sangue e você deverá estar em jejum por 12 horas antes da coleta.

Você não terá gastos com esta pesquisa. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais capacitados e os materiais utilizados para a coleta de sangue são esterilizados e serão abertos, utilizados e descartados em sua presença. Sendo assim, o risco de infecção é muito pequeno, mas você poderá sentir um leve desconforto devido à picada da agulha.

Sempre que você desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre as etapas do estudo. A qualquer momento, você poderá recusar-se a continuar participando do estudo, podendo retirar seu consentimento sem sofrer qualquer

penalidade ou prejuízo. Sua identificação e as informações obtidas pela sua participação serão mantidas em sigilo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso a esses dados.

Os resultados da pesquisa serão divulgados entre profissionais estudiosos do assunto, mas nenhum participante será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Em caso de dúvidas, esclarecimentos ou reclamações entre em contato com:

Pesquisador Responsável: José Albuquerque de Figueiredo Neto

Rua Barão de Itapary, 227, 4º andar, Centro. São Luís – MA. CEP: 65020-070

Telefone para contato: (98) 2109-1000

Para questões éticas relacionadas à pesquisa entre em contato com: Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Universitário Presidente Dutra

Rua Barão de Itapary, 227, 4º andar, Centro. São Luís – MA. CEP: 65020-070

Telefone para contato: (98) 2109-1250

#### DADOS DA PARTICIPANTE:

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

José Albuquerque de Figueiredo Neto (CRM-MA 2758) - Pesquisador Responsável

São Luís – MA, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_



## APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO

FICHA-PROTOCOLO Nº _____ PRONTUÁRIO Nº _____	Data da entrevista: ____/____/____
---	------------------------------------

I. IDENTIFICAÇÃO	
Nome: _____	Iniciais: _____
Endereço: _____ Telefone: _____	
Data de Nascimento: ____/____/____	
Idade: (1) <15 anos    (2) 15-39 anos    (3) 40 ou mais anos	
II. DADOS SOCIOECONÔMICOS	
<b>1. Cor da pele auto-referida:</b> (1) Branca (2) Preta (3) Amarela (4) Parda (6) Indígena	<b>2. Estado Civil:</b> (1) Solteira (2) Casada/ União consensual (3) Desquitada ou separada judicialmente (4) Divorciada (5) Viúva
<b>3. Escolaridade</b> (1) Sem instrução e menos de 1 ano de estudo (2) Ensino fundamental incompleto (3) Ensino fundamental completo	(4) Ensino Médio incompleto (5) Ensino Médio completo (6) Ensino Superior incompleto (7) Ensino Superior completo
<b>4. Ocupação:</b> (1) Empregado (2) Conta própria (3) Trabalhador doméstico (4) Trabalhadores na produção para o	(5) Não remunerado (6) Empregadores (7) Trabalhadores na construção para o próprio uso

próprio consumo	
<b>5. Renda mensal domiciliar <i>per capita</i></b> (1) Sem rendimento a $\frac{1}{4}$ (2) Mais de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ (3) $\frac{1}{2}$ a 1 (4) 1 a 2 (5) 2 a 3 (6) 3 a 5 (7) mais de 5	<b>6. Classe econômica (ABEP)</b> (1) A/B (2) C (3) D/E
<b>7. Numero de membros residentes</b> (1) Sozinha (2) 1 a 3 pessoas	(3) 4 a 6 pessoas (4) 7 pessoas ou mais.

<b>III. HÁBITOS DE VIDA</b>
<b>13. Tabagismo</b> (1) fuma durante a gravidez (2) não fuma (3) parou antes da gravidez
<b>14. Etilista?</b> (1) bebe durante a gravidez (2) não bebe (3) parou antes da gravidez
<b>15. Se SIM, qual frequência?</b> (1) 4 a 7 vezes por semana (diariamente ou quase) (2) Até 3 vezes por semana (fins de semana) (3) Eventualmente / raramente
<b>16. Atividade física</b> (1) sim (2) não
<b>17. Se SIM, qual frequência?</b> (1) 4 a 7 vezes por semana (2) Até 3 vezes por semana (3) Eventualmente / raramente
<b>II. ANTECEDENTES FAMILIARES, CLÍNICOS E OBSTÉTRICOS</b>
<b>18. Antecedentes familiares de pré-eclâmpsia/eclâmpsia</b> (1) sim (2) não (3) se SIM, grau de parentesco _____
<b>19. Paridade</b>

(1) Nulípara (2) Primípara (3) Multípara

**20. Gestação gemelar**

(1) sim (2) não

**21. Idade Gestacional**

(1) Menos de 28 semanas (2) 28 a 37 semanas (3) 38 semanas ou mais

**22. Hipertensão arterial/ pré-eclâmpsia**

(1) sim (2) não

**23. Outras co-morbidades**

(1) nefropatia, (2) lupus, (3) Diabetes *mellitus*

**24. Infecções maternas (trato urinário, periodontal, por clamídia e pelo citomegalovírus)**

(1) sim (2) não (3) se sim, qual (is) ? \_\_\_\_\_

**25. Doença Reumática**

(1) sim (2) não

**26. Antecedente pessoal de pré-eclâmpsia/eclâmpsia (Recorrência)**

(1) sim (2) não

**27. Diagnóstico atual**

(1) Pré-eclâmpsia grave (2) Pré-eclâmpsia leve

**28. Intervalo interpartal**

(1) < 2 anos (2) 2 -< 5 anos (3) ≥ 5 anos

**29. Coabitação sexual**

(1) < 2 anos (2) 2 -< 5 anos (3) ≥ 5 anos

**30. Troca de parceiros sexuais**

(1) sim (2) não (3) se sim, quantos? \_\_\_\_\_

**MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS**

31. Estado nutricional pré-gravídico		32. Estado nutricional gestacional	
<b>Peso (kg):</b>	<b>Altura (cm):</b>	<b>Peso (kg):</b>	<b>Altura (cm):</b>
<b>IMC (kg/ m<sup>2</sup>):</b>		<b>IMC (kg/ m<sup>2</sup>):</b>	
(1)baixo peso (IMC<18,5kg/m <sup>2</sup> )		(1)baixo peso (IMC<18,5kg/m <sup>2</sup> )	
(2)eutrofia (IMC 18,5-24,9kg/m <sup>2</sup> )		(2)eutrofia (IMC 18,5-24,9kg/m <sup>2</sup> )	
(3)sobrepeso (IMC>25kg/m <sup>2</sup> )		(3)sobrepeso (IMC>25kg/m <sup>2</sup> )	
(4) obesidade (IMC>30kg/m <sup>2</sup> )		(4) obesidade (IMC>30kg/m <sup>2</sup> )	

<b>33. Obesidade em graus</b> (1) pré-obeso (IMC 25-29,9kg/m <sup>2</sup> ) (2) obesidade classe I (IMC 30,0-34,9kg/m <sup>2</sup> )	(3) obesidade classe II (35,0-39,9kg/m <sup>2</sup> ) (4) obesidade classe III (IMC>40,0kg/m <sup>2</sup> ).
<b>34. Ganho de peso na gravidez (kg):</b> (1) 12,5 – 18 (2) 11- 16 (3) 7 – 11,5 (4) 5-9	
<b>35. Edema:</b> (1) sim (2) não	
<b>1ª Circ. Quadril (cm):</b>	<b>2ª Circ. Quadril (cm):</b>
Média da Circ. Quadril (cm): Razão Circunferência Quadril: CA/Quadril (1) ≤até 0,85- Normal (2) >0,85-Alterado	
<b>1ª P.A.S (mmHg) sentada:</b> <b>2ª P.A S (mmHg) sentada:</b>	<b>Média P.A.S (sentada):</b> (1) <130mmHg (2) ≥130mmHg
<b>1ª P.A.D (mmHg) sentada:</b> <b>2ª P.A.D (mmHg) sentada:</b>	<b>Média P.A.D (sentada):</b> (1) <80Hg (2) ≥80Hg
<b>RESULTADOS EXAMES LABORATORIAS</b>	
<b>Proteinúria (24 horas)</b>	
<b>Hemoglobina glicada A1c</b>	_____ %
<b>Glicemia Basal</b>	_____ mg/ dL
<b>Glicemia Pós- prandial</b>	_____ mg/ dL
<b>GTT</b>	_____ mg/ dL
<b>Colesterol Total</b>	_____ mg/ dL
<b>HDL Colesterol</b>	_____ mg/ dL
<b>LDL Colesterol</b>	_____ mg/ dL
<b>Triglicérides</b>	_____ mg/ dL
<b>Sódio</b>	_____ mg/ dL
<b>Progesterona</b>	_____ mg/ dL
<b>Uréia</b>	_____ mg/ dL
<b>androstenediona</b>	_____ mg/ dL
<b>Cálcio</b>	_____ mg/ dL
<b>prolactina</b>	_____ mg/ dL

<b>Potássio</b>	_____ mg/ dL
<b>testosterona</b>	_____ mg/ dL
<b>testosterona livre</b>	_____ mg/ dL
<b>Creatinina</b>	_____ mg/ dL
<b>insulina</b>	_____ mg/ dL
<b>TSH</b>	_____ mg/ dL
<b>Citocinas inflamatórias</b>	_____ mg/ dL
<b>Hemoglobina glicosilada</b>	_____ mg/ dL

Fonte: OMS (1998); Institute of Medicine (IOM-2009); VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO – DBH Hipertensão em situações especiais (2010)