

**ERICA GIOVANA BARREIRO**

**POLIMORFISMOS GÊNICOS DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL  
VASCULAR (VEGF) EM GESTANTES COM DISTÚRBIOS  
HIPERGLICÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2009

**ERICA GIOVANA BARREIRO**

**POLIMORFISMOS GÊNICOS DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL  
VASCULAR (VEGF) EM GESTANTES COM DISTÚRBIOS  
HIPERGLICÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Estela Bevilacqua

São Paulo  
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Barreiro, Erica Giovana.

Polimorfismos gênicos do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em gestantes com distúrbios hiperglicêmicos / Erica Giovana Barreiro. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia do Trofoblasto.

Versão do título para o inglês: Gene polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) in pregnant women with hyperglycemic disorders.

Descritores: 1. Placenta 2. Angiogênese 3. VEGF 4. Polimorfismos 5. Diabete mellitus 6. Hiperglicemia gestacional I. Bevilacqua, Estela Maris Andrade Forell II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Tecidual. III. Título.

ICB/SBIB41/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Erica Giovana Barreiro.

Título da Dissertação: Polimorfismos gênicos do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em gestantes com distúrbios hiperglicêmicos.

Orientador(a): Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

*Dedico essa tese aos meus pais  
Elesio Barreiro e Elisete Bassan  
Barreiro, que sempre me apoiaram e  
respeitaram minhas escolhas de vida.*

## AGRADECIMENTOS

A minha família pela paciência e compreensão.

Aos colaboradores do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia da UNESP, pela paciência e dedicação para coleta das amostras.

Aos amigos do Laboratório Citofisiologia do Trofoblasto, especialmente a Fernanda Carini, Rose, Mariane, Sara, Aline, Karol e Carla pela amizade e apoio durante o trabalho.

Aos amigos, Juliane e Alexandre pela admirável ajuda no momento em que mais precisei.

A Camila Franchim do laboratório de Obstetrícia Fisiológica Experimental da UNIFESP pela grande amizade e ajuda.

A Dra. Silvia Daher do laboratório de Obstetrícia Fisiológica Experimental da UNIFESP, por tudo que me ensinou.

A Professora Estela Bevilacqua, por toda paciência e delicadeza e principalmente por todo conhecimento que me passou nesse período que trabalhamos juntas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela ajuda financeira (bolsa de pesquisa), durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

BARREIRO, E.G. **Polimorfismos gênicos do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em gestantes com distúrbios hiperglicêmicos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A angiogênese é um processo essencial para a formação placentária. Dentre os muitos fatores envolvidos neste evento biológico, destaca-se de forma preponderante o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), cuja produção é controlada por genes, que podem apresentar variantes polimórficas diversas. As conseqüências funcionais destas variações não estão ainda completamente elucidadas, embora algumas tenham sido já associadas a um comprometimento da angiogênese em diversos sistemas biológicos. Por outro lado, alterações morfológicas na formação, distribuição e arranjo dos vasos placentários foram descritas na placenta de gestantes com distúrbios hiperglicêmicos como a *Diabete mellitus* e a hiperglicemia moderada. Particularmente nos casos de hiperglicemia moderada, a adaptação vascular observada parece estar relacionada à manutenção da capacidade funcional placentária. Na diabete, este achado foi correlacionado à expressão protéica e gênica atípica de determinados fatores angiogênicos na interface materno-fetal, enquanto que em outras condições hiperglicêmicas a provável participação destes fatores ainda não foi completamente determinada. Desta forma, partindo da hipótese de que as alterações placentárias vasculares em gestantes hiperglicêmicas podem ser decorrentes da expressão ou produção atípica do VEGF e que esta por sua vez pode ser decorrente de polimorfismos gênicos, o objetivo deste estudo foi avaliar polimorfismos do gene deste fator de crescimento em placentas de gestantes com distúrbios hiperglicêmicos. Foi realizada a análise dos polimorfismos -460C/T, -634G/C e 936C/T do gene do VEGF em fragmentos de vilos coriônicos de gestantes normoglicêmicas, com hiperglicemia moderada e com *Diabete mellitus* prévia à gestação, denominados respectivamente de grupo IA, IB e IIB. Todo o material foi fornecido pelo Serviço de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. A genotipagem dos polimorfismos do VEGF foi realizada através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), seguida de digestão por enzima de restrição. As freqüências de distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos do VEGF foram comparadas entre os grupos hiperglicêmicos (IB e IIB) e

o grupo controle. As frequências genóticas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram observadas diferenças significantes nas frequências genóticas e alélicas do polimorfismo -460C/T do gene do VEGF em placentas de gestantes hiperglicêmicas (grupos IB e IIB) quando comparadas entre si, mas não com o grupo controle. Diferenças estatísticas nas frequências genóticas e alélicas do polimorfismo -634G/C VEGF foram detectadas nos grupos hiperglicêmicos em geral comparados ao grupo controle. Não foram identificadas diferenças nas frequências genóticas e alélicas do polimorfismo 936C/T do VEGF entre os grupos avaliados. Em conjunto, nossos achados sugerem que a resposta placentária a distúrbios hiperglicêmicos pode estar correlacionada à presença dos dois polimorfismos: -460C/T e 634C/G. No entanto, nenhuma correlação direta funcional positiva foi observada com a angiogênese observada nas placentas de gestações associadas à hiperglicemia moderada.

Palavras-chave: Polimorfismo; VEGF; Placenta; Hiperglicemia; Angiogênese.



## ABSTRACT

BARREIRO, E.G. **Gene polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) in pregnant women with hyperglycemic disorders** 2009. Master thesis (Cellular and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The angiogenesis is a process essential for placental formation. Among the many factors involved in this biological event, the factor most active is the vascular endothelial growth factor (VEGF), whose production is controlled by genes, which may present different polymorphic variants. The functional consequences of these changes are not yet fully elucidated, although some have been associated with an impairment of angiogenesis in various biological systems. Moreover, morphological changes in distribution and arrangement of the placental vessels were described in the placenta of pregnant women with hyperglycemic disorders such as diabetes mellitus and mild hyperglycemia. Particularly in cases of mild hyperglycemia, the observed vascular adaptation seems to be related to the maintenance of functional placenta. In diabetes, this finding was correlated with the atypical gene and protein expression of certain angiogenic factors in maternal-fetal interface, while in other hyperglycemic conditions the likely participation of these factors has not been fully determined. Thus, based on the hypothesis that placental vascular changes in hyperglycemic pregnant women may be due to atypical expression or production of VEGF and that this in turn may be caused by gene polymorphisms, the objective of this study was to assess polymorphisms of this gene factor growth in placentas of women with hyperglycemic disorders. The analysis of the polymorphisms of the VEGF gene was performed in fragments of chorionic villi of normoglycemic, mild hyperglycemic and diabetic pregnant women, respectively named of group IA, IB and IIB. All specimens were provided by the Serviço de Serviço de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Genotyping of the VEGF gene polymorphisms -460C/T, -634G/C and 936C/T was done by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism methods. The frequency of VEGF alleles and genotype distribution were compared among the hyperglycemic and control groups. The genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. We have observed significant differences of VEGF -460C/T polymorphism between the hyperglycemic placentas (IB X IIB), but not compared to control group. Statistical differences in the genotypic and allelic frequencies of C of VEGF -634G/C were detected

in hyperglycemic groups in general in comparison to controls. There were no significant differences in allelic or genotype frequencies among the evaluated groups. Taken together our findings suggest that the placental response to hyperglycemic disturbs may be correlated to the presence of both -460C/T and -636C/G polymorphism of the VEGF gene. However, no direct functional correlation was detected between these VEGF polymorphisms and the intense angiogenesis seen in placentas of mild hyperglycemia-associated gestation.

Key words: Polymorphism; VEGF; Placenta; Hyperglycemia; Angiogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema representativo do gene do VEGF demonstrando as posições dos três polimorfismos de base única (SNPs) (modificado de LIN *et al.*, 2008) ..... 26
- Figura 2** - Gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio. Genótipos após digestão enzimática (BstUI). Na coluna M temos o marcador de 50pb (DNA Ladder). Colunas 1 e 3: genótipo TT - fragmento de 175pb (seta contínua). Colunas 2 e 4: genótipo CT - fragmentos de 175pb (seta contínua) e 155pb (seta tracejada). Coluna 5: genótipo CC - fragmento de 155pb (seta tracejada) ..... 41
- Figura 3** - Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Genótipos após digestão enzimática (BsmFI). Na coluna M temos o marcador de 100pb (DNA Ladder). Colunas 1, 2 e 3: genótipo CG - fragmento de 304pb (seta tracejada), 193pb (seta contínua) e 111pb (seta pontilhada). Coluna 4: genótipo CC - fragmento de 304pb (seta tracejada). Coluna 5: genótipo GG - fragmentos de 193 (seta contínua) e 111pb (seta pontilhada)..... 44
- Figura 4** Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Genótipos após digestão enzimática (NlaIII). Na coluna M temos o marcador de 100pb (DNA Ladder). Coluna 1, 3, 5 e 6: genótipo CC - fragmentos de 208pb (seta contínua). Coluna 4: genótipo CG - fragmentos de 208pb (seta contínua), 122pb [seta pontilhada] e 86pb (seta tracejada). Coluna 2: genótipo TT - fragmentos de 122pb (seta pontilhada) e 86pb (seta tracejada) ..... 47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Valores glicêmicos séricos de referência para a normalidade. Valores obtidos em jejum e após alimentação controlada em 3 horas a intervalos de 1 hora .....	31
<b>Tabela 2</b>	Características da amostra estudada .....	41
<b>Tabela 3</b>	Frequências genotípicas do gene VEGF quanto ao polimorfismo -460C/T observadas nos grupos controle e hiperglicemia moderada .....	42
<b>Tabela 4</b>	Frequências genotípicas do gene VEGF quanto ao polimorfismo -460C/T observadas nos grupos controle e diabetes clínica .....	43
<b>Tabela 5</b>	Frequências genotípicas do gene VEGF quanto ao polimorfismo -460C/T observadas entre os grupos hiperglicêmicos .....	43
<b>Tabela 6</b>	Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -460C/T nos grupos controle e hiperglicemia moderada.....	43
<b>Tabela 7</b>	Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -460C/T nos grupos controle e diabetes clínica .....	43
<b>Tabela 8</b>	Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -460C/T nos grupos hiperglicêmicos.....	44
<b>Tabela 9</b>	Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634C/G observadas nos grupos controle e hiperglicemia moderada.....	45
<b>Tabela 10</b>	Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634C/G observadas nos grupos controle e diabetes clínica .....	45
<b>Tabela 11</b>	Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634C/G observadas entre os grupos com alterações glicêmicas .....	45
<b>Tabela 12</b>	Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -634C/G nos grupos controle e hiperglicemia moderada.....	46
<b>Tabela 13</b>	Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -634G/C nos grupos controle e diabetes clínica .....	46
<b>Tabela 14</b>	Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -634G/C nos grupos com alterações de glicemia.....	46
<b>Tabela 15</b>	Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo 936C/T observadas em grupo controle e hiperglicemia moderada.....	47
<b>Tabela 16</b>	Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo 936C/T observadas em grupo controle e diabetes clínica .....	48
<b>Tabela 17</b>	Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo 936C/T observadas em grupos com alterações glicêmicas.....	48
<b>Tabela 18</b>	Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo 936C/T nos grupos controle e hiperglicemia moderada.....	48
<b>Tabela 19</b>	Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo 936C/T nos grupos controle e diabetes clínica .....	48
<b>Tabela 20</b>	Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo 936C/T entre os grupos com alterações glicêmicas.....	49

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 OBJETIVO</b> .....	19
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
<b>3.1 Vasculogênese e angiogênese</b> .....	22
<b>3.1.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)</b> .....	23
<b>3.1.1.1 Genética e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)</b> .....	24
<b>3.2 Vasculogênese e angiogênese no período gestacional</b> .....	26
<b>3.2.1 VEGF na placenta Humana</b> .....	27
<b>3.2.3 Modificações placentárias em gestantes com distúrbios hiperglicêmicos</b> .....	28
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
<b>4.1 Sujeito</b> .....	31
<b>4.2. Aspectos Éticos</b> .....	32
<b>4.3 Material</b> .....	32
<b>4.4 Métodos</b> .....	33
<b>4.4.1 Extração de DNA de Placenta Humana</b> .....	33
<b>4.4.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)</b> .....	34
<b>4.4.2.1 Ciclagem de temperatura para detecção do polimorfismo -460C/T</b> .....	34
<b>4.4.2.2 Ciclagem de temperatura para detecção do polimorfismo -634C/G</b> .....	34
<b>4.4.2.3 Ciclagem de temperatura para detecção do polimorfismo 936C/T</b> .....	35
<b>4.4.3 Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)</b> .....	35
<b>4.4.3.1 Identificação do polimorfismo -460C/T</b> .....	35
<b>4.4.3.2 Identificação do polimorfismo -634C/G</b> .....	36
<b>4.4.3.3 Identificação do polimorfismo 936C/T</b> .....	36
<b>4.5 Análise Estatística</b> .....	37
<b>5 RESULTADOS</b> .....	38
<b>5.1 Características das Amostras</b> .....	39
<b>Grupo IA – Normoglicêmica</b> .....	39
<b>Grupo IB – Hiperglicêmica Moderada</b> .....	39
<b>Grupo IIB - Diabética clínica</b> .....	40
<b>5.2 Amplificação do gene do VEGF para análise do polimorfismo -460C/T</b> .....	41
<b>5.2.1 Análise do polimorfismo -460C/T do gene do VEGF</b> .....	42

<b>5.3 Amplificação do gene do VEGF para análise do polimorfismo -634C/G.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3.1 Análise do polimorfismo -634C/G do gene do VEGF .....</b>	<b>44</b>
<b>5.4 Amplificação do gene do VEGF para análise do polimorfismo 936C/T .....</b>	<b>46</b>
<b>5.4.1 Análise do polimorfismo 936C/T do gene do VEGF .....</b>	<b>47</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>

*Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento fetal depende do rápido acesso à circulação materna pelo trofoblasto, uma vez estabelecido este acesso, inicia-se o desenvolvimento placentário cuja fisiologia envolve principalmente o transporte de nutrientes, gases e anticorpos entre outros muitos fatores e co-fatores metabólicos vitais para a gestação. A plena funcionalidade deste sistema depende também da formação de uma rede vascular fetal e uterina, que permita adaptações específicas para cada fase gestacional (CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004). Neste contexto, dois processos são fundamentais: a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos através da diferenciação *in situ* de angioblastos. A partir destes vasos, por meio da angiogênese, novos capilares são formados resultando em um plexo vascular ramificado (RISAU *et al.*, 1998). De modo geral, as vias de ativação do processo angiogênico incluem o aumento na produção de moléculas com ação direta ou indireta na ativação das células endoteliais e/ou de fatores pró-angiogênicos e a regulação da expressão e/ou da ativação de inibidores fisiológicos deste mecanismo (LIEKENS, 2001).

Estudos referentes ao desenvolvimento, migração e proliferação das células endoteliais em processos patológicos, como, por exemplo, a angiogênese tumoral, têm resultado na identificação e caracterização de inúmeros fatores de crescimento que atuam sob estas células. Dentre os principais fatores de ativação, destaca-se a família do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) que inclui o VEGF-A ou simplesmente VEGF, o Fator de Crescimento Placentário (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o VEGF-E (encontrado no genoma do vírus parapoxvirus), VEGF-F (derivado do veneno de cobra), e seus receptores VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3 (Flt-4) (FERRARA *et al.*, 2005; ROY *et al.*, 2006). O gene que codifica o VEGF está localizado no cromossomo 6, banda p21 e contém uma região codificadora com 8 exons e 7 introns (VINCENTI *et al.*, 1996). A perda de um simples alelo do VEGF leva a letalidade embrionária, o que torna este um fator único no desenvolvimento do sistema vascular (VEIKKOLA e ALITALO, 1999; LIEKENS *et al.*, 2001).

Polimorfismos do gene do VEGF têm sido relacionados a variações nos níveis de produção e a intercorrências obstétricas (RENNER *et al.*, 2000; WATSON *et al.*, 2000).



O polimorfismo 936C/T de VEGF está relacionado à menor produção desta proteína e a ocorrência de pré-eclâmpsia e parto prematuro (PAPAZOGLU *et al.*, 2004).

O VEGF atua sobre as células endoteliais promovendo proliferação, migração e sobrevivência destas células e no desenvolvimento dos vasos sanguíneos no que se refere à organização das células em tubos e a formação do lúmen vascular (SOTILLE, 2004). Durante a gestação, o VEGF é expresso nos sítios de implantação embrionária, onde se acredita seja responsável pela formação dos vasos placentários (LIEKENS *et al.*, 2001).

Na placenta humana o VEGF atua na vascularização vilosa durante o primeiro trimestre da gestação e no termo, na manutenção da integridade e permeabilidade vascular. No primeiro trimestre de gestação, este fator é produzido pelo trofoblasto, apresentando maior expressão no citotrofoblasto viloso. No trofoblasto extraviloso, no entanto, sua presença tem sido questionada (SHERER e ABULAFIA, 2001). Já os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos pelas células endoteliais dos vilos placentários, enquanto que o VEGFR-1 é encontrado no trofoblasto extraviloso (REGNAULT *et al.*, 2002).

Estudos sugerem que o VEGF derivado de células trofoblásticas apresenta função parácrina e autócrina, agindo no remodelamento e permeabilidade da micro-circulação uterina e na formação de vasos fetais nos vilos placentários, aumentando assim as trocas gasosas materno/fetal e ainda exercendo uma função trófica sobre a fisiologia das próprias células trofoblásticas (SHER e ABULAFIA, 2001).

Os níveis de VEGF circulantes podem variar durante a gravidez e com as condições clínicas da gestante. Geralmente são mais altos no primeiro trimestre, declinando nos meses subsequentes. Em casos de hipertensão ou de diabetes gestacional, no entanto, níveis elevados podem persistir por toda a gestação (LYGNOS *et al.*, 2006). De acordo com Wathen e colaboradores (2006) a concentração aumentada deste fator entre a 16<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana de gestação podem sugerir a ocorrência de pré-eclâmpsia.

O reconhecimento dos genes que codificam fatores de crescimento e citocinas e seus receptores, assim como a identificação de polimorfismos dos mesmos, trouxeram novas perspectivas para avaliação destes mediadores em diferentes condições clínicas.

Distúrbios hiperglicêmicos ocorrem em cerca de 20% das gestações. Sete por cento representam casos de *Diabetes mellitus* pré-estabelecida, enquanto que nos restantes 13% , prevalecem distúrbios com características metabólicas distintas, mas que

podem levar a taxas semelhantes de morbidade e mortalidade do recém-nascido. De acordo com Rudge e colaboradores (2000) as gestantes com distúrbios glicêmicos podem ser classificadas com base na tolerância à glicose oral 100 g (100g-OGTT) e do perfil glicêmico em: grupo AI - mulheres normoglicêmicas, grupo AII - inclui pacientes saudáveis que desenvolvem diabetes durante o período gestacional; grupo BI - denominado hiperglicemia moderada, composto por mulheres grávidas com tolerância à glicose normal, mas com alterações nos resultados do perfil glicêmico e; o grupo IIB - formado por mulheres grávidas com *Diabetes mellitus* prévia a gestação.

Na *Diabete mellitus* há elevação crônica de glicemia de jejum e/ou pós-brandial por defeito absoluto/relativo da produção de insulina ou diminuição de seu efeito em determinados órgãos. A hiperglicemia crônica desencadeia distúrbios metabólicos na proliferação endotelial e no crescimento vascular (MAYHEW *et al.*, 2004).

Placentas de gestantes com *Diabetes mellitus* apresentam área vascular e índice de capilarização menores, com fragilidade da parede vascular associada à diminuição na espessura da membrana basal capilar sugerindo deficiências funcionais. As placentas das gestantes com hiperglicemia moderada apresentam alterações morfológicas semelhantes às das diabéticas, além de maior incidência de endoarterite e um maior número de vilosidades e vasos vilositários (CALDERON, 2003; PIETRO, 2008). Aparentemente estas adaptações visam manter a capacidade funcional placentária, facilitando a passagem de glicose para o feto, embora levem a formação de fetos macrossômicos. Nas gestantes diabéticas com glicemia controlada, há aumento da expressão do Fator de Crescimento de Fibroblasto-2 (FGF-2), mas não de VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 (JANOTA *et al.*, 2003). Por outro lado, estudo sobre a expressão protéico, realizado por Pietro (2008) demonstrou maior expressão do receptor VEGFR-2 em relação ao VEGFR-1 principalmente nas células endoteliais o que pode estar relacionado ao aumento da vascularização observada morfológicamente nas placentas de gestantes com hiperglicemia moderada, estes resultados ainda não foram esclarecidos, mas é de suma importância para auxiliar a compreensão da patofisiologia desta ocorrência.

*Objetivo*

## 2 OBJETIVO

Nossa hipótese é que as alterações vasculares encontradas na placenta de gestantes com distúrbios hiperglicêmicos estão relacionadas à expressão gênica do VEGF. Neste contexto, este estudo tem como objetivo avaliar os polimorfismos deste gene nas regiões vilosas das placentas de mulheres com alterações glicêmicas do tipo hiperglicemia moderada. Como parâmetros de referência foram utilizadas placentas de mulheres normoglicêmicas e de mulheres com *Diabete mellitus* prévia à gestação. Espera-se que os resultados alcançados neste trabalho contribuam para a caracterização dos processos envolvidos nas causas e/ou conseqüências desta alteração gestacional.

*Revisão da Literatura*

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Vasculogênese e angiogênese

O desenvolvimento de vasos sanguíneos depende basicamente de dois mecanismos, a vasculogênese e a angiogênese. Durante a vasculogênese ocorre a formação de capilares primitivos por intermédio da diferenciação de células tronco hemangiogênicas derivadas do mesênquima. Estas células diferenciam-se em hemangioblastos a partir das quais se originam os angioblastos, progenitores das células endoteliais (RIBATTI *et al.*, 2002). A angiogênese por sua vez, consiste na formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, resultando em um plexo vascular alongado e altamente ramificado (CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004).

A formação de novos vasos sanguíneos *in vivo* a partir de outros vasos pré-existentes inicia-se com o aumento da permeabilidade vascular, fragmentação da membrana basal e digestão da matriz adjacente (ROY *et al.*, 2006). Estes eventos são seguidos por proliferação e migração das células endoteliais em direção ao estímulo angiogênico formando cordões celulares alinhados. Nesta etapa as células assumem uma configuração alongada e bipolar. Posteriormente ocorre a coalescência de vacúolos intracelulares e espaços intercelulares, seguido da maturação funcional das células endoteliais. Este processo inclui o recrutamento de pericitos e eventualmente, também de células musculares para a sustentação do vaso recém formado (ZYGUMUNT *et al.*, 2003; ROY *et al.*, 2006).

A angiogênese *in vivo* é um processo dinâmico e essencial no desenvolvimento embrionário bem como em tecidos de organismos adultos sujeitos a constantes ciclos de renovação, como os tecidos ósseo e uterino (KLAGSBRUN e D'AMORE, 1991; ZYGUMUNT *et al.*, 2003; ROY *et al.*, 2006). De modo geral, o aparelho reprodutor feminino apresenta alta atividade angiogênica, como por exemplo, o ovário, durante o desenvolvimento folicular e formação do corpo lúteo (REYNOLDS *et al.*, 2002) e a formação da placenta (DEMIR *et al.*, 2007).

Além de participar do desenvolvimento e das funções orgânicas normais, a formação de vasos sanguíneos também pode ocorrer em condições patológicas de forma persistente e desregulada como no crescimento de tumores, fibroses, retinopatias e

artrites reumatóides (SHEPHERD e SRIDHAR, 2003; SUGANTHALAKSHMI *et al.*, 2006; HOWELL *et al.*, 2007). Particular atenção tem sido dada nos últimos anos ao estudo do desenvolvimento, migração e proliferação das células endoteliais em tumores, resultando na identificação e caracterização de inúmeros fatores de crescimento que atuam sob estas células. Dentre estes fatores, destacam-se o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), fator de crescimento de transformação (TGF), fator de necrose tumoral (TNF), angiogenina e prostaglandinas. Entretanto, estes agentes têm pouco ou nenhuma ação mitogênica sobre as células endoteliais vasculares, o que é observado apenas com o FGF e o VEGF *in vitro* e *in vivo* (ZYGMUNT *et al.*, 2003).

### 3.1.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) inicialmente conhecido como Fator de Permeabilidade Vascular (VPF) (SENGER *et al.*, 1983) foi descoberto como uma glicoproteína secretada por células tumorais capaz de desencadear aumento de permeabilidade vascular para passagem de macromoléculas circulantes nas vênulas e pequenas veias (SENGER *et al.*, 1990). Posteriormente verificou-se que o VEGF atuava diretamente nas células endoteliais cultivadas, induzindo o acúmulo de cálcio citoplasmático (BROCK *et al.*, 1991) e mudança na forma, divisão e migração celular (FAVARD *et al.*, 1991).

Atualmente já foram descritos cerca de dez membros da família VEGF, sendo eles: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (encontrado no genoma do vírus parapoxvirus), VEGF-F (derivado do veneno de cobra), fator de crescimento placentário (PlGF) e seus receptores tipo tirosina quinase, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR em humanos ou Flk-1 em camundongo) e VEGFR-3 (Flt-4) (FERRARA *et al.*, 2005; ROY *et al.*, 2006). Outros receptores podem se ligar a membros da família VEGF, como a Neuropilina (Nrp)-1 e Nrp-2, que são receptores para semaforinas (KLAGSBRUN *et al.*, 2002). Os membros da família VEGF parecem apresentar afinidade para um ou mais receptores. O receptor VEGFR-1 pode se ligar tanto ao VEGF-A quanto ao VEGF-B e ao PlGF; já o receptor VEGFR-2 aceita ligação com as moléculas VEGF-A, VEGF-C e

VEGF-D. O VEGFR-3 apresenta afinidade para os fatores VEGF-C e VEGF-D (ROY *et al.*, 2006).

VEGF-A ou VEGF, uma glicoproteína homodimérica e uma molécula chave indutora da angiogênese e vasculogênese, pois induz a proliferação, migração e formação do tubo vascular. Atua inicialmente pela ligação com os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, ambos envolvidos no desenvolvimento dos capilares sanguíneos durante a embriogênese (SHALABY *et al.*, 1995; FERRARA, 2000; HIRATSUKA *et al.*, 2005). VEGF-A também pode se ligar aos receptores Nrp-1 e Nrp-2 (KLAGSBRUN *et al.*, 2002).

Camundongos com genes *knockout* para o VEGF e VEGFR-2, não apresentam diferenciação de angioblastos em células endoteliais (FERRARA *et al.*, 2005), enquanto que mutações no gene VEGFR-1 resulta na formação de vasos anormais durante o desenvolvimento embrionário (FONG *et al.*, 1995).

Evidências experimentais também demonstram que o VEGF é capaz de aumentar a permeabilidade vascular ao se ligar ao receptor VEGFR-2, desencadeando vias de sinalização mediadas pela guanilato ciclase e cGMP e dependentes de óxido nítrico (NO). O aumento nos níveis de cGMP parece melhorar a permeabilidade vascular aumentando as fenestrações e os canais de transcitose (BATES *et al.*, 2002). Desta forma, o VEGF estimula o extravasamento de fluidos e proteínas plasmáticas, incluindo as fibrinas, o que contribui para migração das células endoteliais pela matriz extracelular (BOOTLE-WILBRAHAM *et al.*, 2001). Além disso, o VEGF causa vaso dilatação por induzir a síntese de óxido nítrico (KROLL *et al.*, 1999) e promove a sobrevida das células endoteliais por induzir a expressão de proteínas anti-apoptóticas, como o Bcl-2 (GERBER *et al.*, 1998).

### 3.1.1.1 Genética e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O gene do VEGF está localizado no cromossomo 6p21.3 com ~14 Kb de peso; sua região codificadora apresenta 8 exons e 7 introns (**Figura 1**) (VINCENTI *et al.*, 1996; FERRARA *et al.*, 2003, 2006; ROY *et al.*, 2005).



Até o momento foram descritos nove isoformas provenientes de *splicing* alternativo, todas apresentando em comum a região exon 1-5, sendo elas: VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>148</sub>, VEGF-A<sub>162</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>165b</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> e VEGF-A<sub>206</sub>. O VEGF-A<sub>165</sub> é a isoforma mais expressa fisiologicamente; pode se ligar aos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, mas apresenta maior afinidade pelo VEGFR-1 (YAMAZAKI e MORITA, 2006).

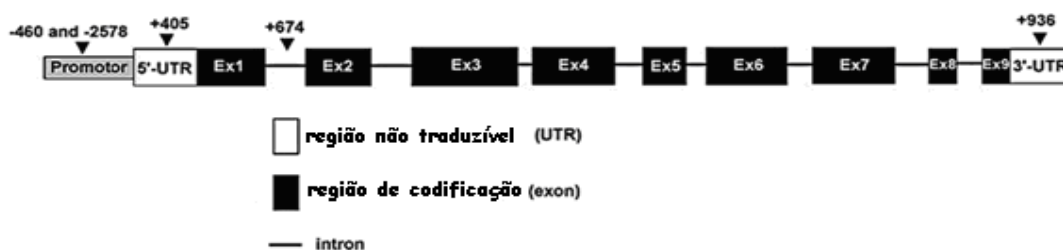
Mutações pontuais ou pequenas deleções e inserções de aminoácidos podem ocorrer por toda extensão do genoma, sendo a maioria das mutações deletadas e eliminadas por seleção natural. As proteínas podem acumular mutações e evoluir por intermédio de substituições mutacionais, seguidas de eliminação ou fixação do fragmento mutado. A presença de duas ou mais variações alélicas em um determinado gene de uma população cujos alelos têm frequência inferior a 0,99 é denominada polimorfismo. Um polimorfismo pode ser estável, de transição (em que uma base púrica é substituída por outra púrica) ou de transversão (em que uma base púrica é substituída por uma pirimídica, ou vice-versa).

Cerca de quinze polimorfismos gênicos do VEGF-A foram descritos até o momento, sendo cinco identificados na região promotora 5' e caracterizados como de funcionalidade significativa (SZETO *et al.*, 2004). Os polimorfismos mais estudados presentes na região promotora são: -460 onde ocorre a troca da base nitrogenada citosina (C) para base timina (T) e o polimorfismo -634 (anteriormente denominado +405), no qual também ocorre a troca de bases nitrogenadas, entre a guanina (G) e a citosina (C). Outro polimorfismo muito estudado é o +936 encontrado na região não tradutora 3' (UTR-3'); neste polimorfismo também ocorre a troca das bases nitrogenadas C e T.

Muitos estudos relacionam estes polimorfismos gênicos a variações nos níveis séricos deste fator de crescimento. Watson e colaboradores (2000) demonstraram que a produção protéica do VEGF-A esta altamente relacionada ao polimorfismo -634. Utilizando estímulo com LPS (lipopolissacarídeos) sobre mononucleares de sangue periférico de pessoas saudáveis, conseguiram concluir que o genótipo GG está relacionado à alta produção de VEGF, enquanto que o genótipo GC com uma produção intermediária e o genótipo CC com a baixa produção deste fator.

Igualmente, também correlacionaram o polimorfismo 936C/G e a produção de VEGF. Níveis mais elevados do VEGF foram associados com genótipo TT, níveis

intermediários com o genótipo CT e uma menor concentração com o genótipo CC (STEVENS *et al.*, 2003). Renner e colaboradores em 2000 encontraram associação entre a maior produção de VEGF com o genótipo CC, entre o nível intermediário de produção e o genótipo CT e níveis baixos para o genótipo TT. Já Geienita e colaboradores (2006) relataram que a alta produção de VEGF foi observada para o genótipo CC e os mais baixos de produção para o genótipo TT.



**Figura 1** - Esquema representativo do gene do VEGF demonstrando as posições dos três polimorfismos de base única (SNPs) (modificado de LIN *et al.*, 2008).

### 3.2 Vasculogênese e angiogênese no período gestacional

Um evento fundamental para a implantação do blastocisto e sua manutenção no ambiente uterino é o aumento da vascularização endometrial para adequação das necessidades embrionárias em relação às trocas gasosas e de nutrientes. Para tanto a vascularização uterina passa por contínuas adaptações, como vasodilatação, aumento da permeabilidade, crescimento e desenvolvimento de novos vasos (REYNOLDS *et al.*, 2002). O sucesso da gestação também depende da vascularização da árvore vilosa da placenta fetal que é contínua ao longo da gestação, embora muito mais acentuada nas fases iniciais (KAUFMANN *et al.*, 2004).

O desenvolvimento do vilos coriônico inicia-se com estruturas trofoblásticas: o citotrofoblasto e o sinciciotrofoblasto, a qual se une também na terceira semana após a concepção, uma camada de células mesenquimais (mesoderma extra-embriônico). As estruturas digitiformes revestidas pelo trofoblasto e preenchidas internamente por mesênquima são denominadas de vilosidades secundárias. A fusão do mesênquima alantoideano ao de origem do mesoderma extra-embriônico, leva ao início da

vasculogênese no interior dos vilos secundários. No vilos terciário, o mesênquima viloso origina células pluripotentes denominadas hemangiogênicas que se diferenciam constituindo os capilares (fetais) placentários. Demir e colaboradores em 2004 demonstraram que neste estágio da placentação tanto o citotrofoblasto quanto células mesenquimais são altamente imunoreativas para o VEGF.

Por volta do 28º dia após a concepção, os capilares fetais já apresentam lúmen e, alguns dias após (32º dia após a concepção) eritrócitos são observados no interior destes lumens. Durante a sexta semana de gestação, observa-se a lamina basal entorno dos vasos vilosos e uma camada incompleta de pericito (DEMIR *et al.*, 2007). Macrófagos placentários ou células de Hofbauer também estão presentes no interior dos vilos atuando nas fases iniciais da vasculogênese placentária, expressando fatores de crescimento angiogênicos, tais como o VEGF (CLARK *et al.*, 1995).

A árvore vilosa cresce de forma contínua, ramificando suas extremidades e aumentando a superfície capilar para as trocas materno-fetais. A superfície do sinciotrofoblasto é banhada por sangue materno extravasado de vasos uterinos rompidos pelo trofoblasto. No segundo trimestre da gestação, a parede dos grandes vasos arteriais (artérias espiraladas) endometriais é invadida por células citotrofoblásticas extravilosas, que substituem parcialmente o revestimento endotelial e muscular destes vasos. Este fenômeno acredita-se, diminui a resistência dos vasos sanguíneos que suprem a placenta e torna-os refratários às substâncias vasoativas do organismo materno (ZYGMENT *et al.*, 2003).

### **3.2.1 VEGF na placenta Humana**

Durante a gestação normal, a expressão do VEGF apresenta diferenças de acordo com a fase gestacional. O VEGF têm sido imunolocalizado no citotrofoblasto viloso e extraviloso, no citoplasma do sinciotrofoblasto, células endoteliais, células musculares lisas, células de Hofbauer e outras células do estroma viloso (SHARKEY *et al.*, 1993, 1998; CLARK *et al.*, 1996, 1998; ZHOU *et al.*, 2002; VUORELA *et al.*, 2006). A intensidade da reação parece sofrer alteração de acordo com a fase da gestação. Segundo alguns estudos é mais intensa no primeiro trimestre de gestação em relação ao terceiro;

em outros, demonstrou-se que esta intensidade não diminui no trofoblasto da placenta a termo (COOPER *et al.*, 1995; CLARK *et al.*, 1996).

### 3.2.3 Modificações placentárias em gestantes com distúrbios hiperglicêmicos

Distúrbios hiperglicêmicos ocorrem em cerca de 20% das gestações. Sete por cento representam casos de *Diabetes mellitus* pré-estabelecida, enquanto que nos restantes 13%, prevalecem distúrbios com características metabólicas distintas, mas que podem levar à taxas semelhantes de morbidade e mortalidade do recém-nascido (MAYHEW, 2002).

Durante a gestação, a sensibilidade dos tecidos à insulina diminui, podendo ocasionar *Diabetes mellitus* gestacional, com elevação dos níveis séricos de insulina para compensar a resistência ao hormônio. Do ponto de vista fisiológico, a resistência à insulina, independente do seu mecanismo, resulta na incapacidade da insulina circulante atuar adequadamente no metabolismo da glicose, levando a um quadro de hiperglicemia persistente e, portanto, causando uma estimulação mais prolongada das células  $\beta$  do pâncreas.

Em relação à gestação, este distúrbio assume graus de importância devido a elevada ocorrência de repercussões neonatais, tais como poliâmnio, hipoglicemia, hipocalcemia, macrossomia, hiperbilirrubinemia, morte fetal e malformações do sistema nervoso e do coração (KERCHE *et al.*, 2005).

A exposição do organismo à hiperglicemia crônica resulta em distúrbios metabólicos de proteínas, lipídios e carboidratos, que se refletem diretamente no sistema circulatório e nervoso (BENJAMIN, 2001). Por outro lado, a exposição a altas concentrações de glicose sistêmica modifica a estrutura da hemoglobina e aumenta a glicosilação destas moléculas levando à deformidade eritrocitária e aumento da viscosidade sanguínea. Estas modificações dificultam a ligação hemoglobina-oxigênio, torna o sistema circulatório deficitário e confere um quadro de hipóxia local (IINO *et al.*, 1996; WATALA *et al.*, 1996).

Alterações vasculares também são frequentemente associadas à hiperglicemia; elas incluem: enfraquecimento da parede capilar, com dilatação e eventualmente rompimento e a formação de micro-aneurismas, hemorragias, edema e microtrombos.

Estas alterações estão presentes principalmente nas retinopatias e comprometimentos renais associados ao diabetes (KHAN e CHAKRABARTI, 2007). *In vitro*, células endoteliais expostas a meios hiperglicêmicos aumentam a produção da matriz extracelular como colágeno e fibronectina além de fatores de coagulação de forma semelhante ao observado *in vivo* em glomerulopatias diabéticas (NERLICH e SCHLEICHER, 1991; ROY *et al.*, 1994).

A hiperglicemia crônica desencadeia distúrbios metabólicos na proliferação endotelial e no crescimento vascular (MAYHEW *et al.*, 2004). As placentas destas gestantes apresentam área vascular e índice de capilarização menores, com fragilidade da parede vascular associada à diminuição na espessura da membrana basal capilar sugerindo deficiências funcionais. As placentas das gestantes com hiperglicemia moderada apresentam alterações morfológicas semelhantes às das diabéticas, além de maior incidência de endoarterite, maior número de vilosidades e vasos vilositários (CALDERON, 2003). Aparentemente estas adaptações visam manter a capacidade funcional placentária, facilitando a passagem de glicose para o feto, embora levem a formação de fetos macrossômicos.

Nas gestantes diabéticas com glicemia controlada, há aumento da expressão do FGF-2, mas não de VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 (JANOTA *et al.*, 2003), diferente da placenta de gestantes normoglicêmicas, em que estes fatores estão presentes. Por outro lado, o perfil de expressão destes fatores em gestantes com hiperglicemia moderada ainda não foi esclarecido, mas é de suma importância para auxiliar a compreensão da patofisiologia desta ocorrência.

A maioria dos estudos relacionados a modificações vasculares placentárias focam principalmente gestantes diabéticas, onde aparentemente não há adaptação vaso-proliferativa. Nestas placentas as complicações vasculares estão relacionadas principalmente à morfologia dos vasos, após a vasculogênese ter ocorrido (BABAWALE *et al.*, 2000). Desta forma, estudos que determinem os fatores atuantes sobre a angiogênese alterada nos domínios placentários de gestantes com hiperglicemia moderada, devem ser buscados para aumentar o conhecimento desta patologia, responsável por altas taxas de mortalidade (0,49%) e morbidade perinatal (11,4%) (RUDGE *et al.*, 1997).

*Material e Métodos*

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Sujeito

Foram selecionadas gestantes entre 18 e 40 anos que iniciaram o pré-natal no Serviço de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP com idade gestacional máxima de 28 semanas. As mulheres foram avaliadas e selecionadas pelo método definido por Rudge e colaboradores (1998), qual compreende na avaliação das gestantes pela associação de dois testes glicêmicos: perfil glicêmico (PG) e teste oral de sobrecarga de glicose - 100g (TTG100g). Para isto, avaliações da glicemia plasmática materna foram realizadas em intervalos de 1 hora em um total de 3 horas.

Os valores de normalidade considerados para dosagem da glicose sérica foram: de 90 mg/dL para glicemia de jejum e 130 mg/dL para as pós-prandiais conforme mostrado na **Tabela 1**. Qualquer resultado alterado nestas referencias de normalidade determina uma resposta inadequada ao teste.

**Tabela 1** - Valores glicêmicos séricos de referência para a normalidade. Valores obtidos em jejum e após alimentação controlada em 3 horas a intervalos de 1 hora.

Teste Clínico	jejum	1 hora	2 horas	3 horas
<b>PG</b>	< 90mg/dL	<130 mg/dL	< 130 mg/dL	< 130mg/dL
<b>TTG 100g</b>	< 105 md/dL	<180 mg/dL	< 155 mg/dL	<140 mg/dL

PG- Perfil glicêmico; TTG – Teste de tolerância a glicose

Desta forma, foram identificados quatro grupos de gestantes com respostas diferenciadas ao TTG100g associado ao perfil glicêmico: grupo IA - composto por gestantes normoglicêmicas, ou seja, sem alterações nos testes glicêmicos; grupo IIA - formado pelas pacientes grávidas, nas quais o início e o diagnóstico do diabetes ou da intolerância à glicose ocorreram durante o período gestacional; grupo IB - denominado hiperglicêmica leve ou moderada, onde as gestantes apesar de demonstrarem o TTG100g normal, possuem picos de hiperglicemia ao longo do dia, diagnosticados pelo PG alterado e, o grupo IIB - formado por mulheres que já eram diabéticas e engravidaram.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionadas gestantes que se enquadravam nos grupos IA, IB e IIB. A triagem das gestantes participantes foi determinada pelos critérios de inclusão: acompanhamento pré-natal e protocolo terapêutico a partir de 28ª semana de gestação; parto no Serviço de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, e pelos critérios de exclusão: gestação gemelar, prematuridade extrema (parto antes da 28ª semana de gestação) e doenças auto-imunes, infecciosas ou genéticas.

#### **4.2 Aspectos Éticos**

Este trabalho foi submetido à avaliação dos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina – UNESP/Botucatu e do Instituto de Ciências Biomédicas – USP, tendo sido aprovado nas duas unidades de ensino (em anexo). As considerações éticas foram baseadas no uso do material para fins científicos que incluíram o sigilo da identidade da paciente, para que estes não venham a constranger instituições ou pessoas envolvidas. As coletas respeitaram os protocolos técnicos do hospital e dos médicos envolvidos. As pacientes foram previamente informadas e o material somente foi utilizado sob expresso livre consentimento das gestantes em formulário próprio de acordo com o Ministério da Saúde.

#### **4.3 Material**

Amostras da região vilosa de placentas de parto normal a termo e de cirurgias cesarianas foram coletadas imediatamente após o parto e processadas em fluxo laminar devidamente esterilizado, os fragmentados foram banhados em solução salina estéril para retirada do excesso de sangue e posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido e freezer -20 °C até a sua utilização.



## 4.4 Métodos

### 4.4.1 Extração de DNA de Placenta Humana

Os fragmentos placentários foram devidamente triturados para posterior extração do DNA genômico pela técnica DTAB/CTAB (Brometo de dodeciltrimetilamônio/Brometo de hexadeciltrimetilamônio) previamente descrita por Gustincich e colaboradores (1991). Para lise das membranas nucleares as amostras foram incubadas em 500  $\mu\text{L}$  da solução de brometo de dodeciltrimetilamônio 12% (DTAB) por 5 minutos a 67 °C. Em seguida foi acrescentado 900  $\mu\text{L}$  de clorofórmio às amostras, que foram então centrifugadas por 2 minutos a 10.000 rpm para separar os restos celulares do sobrenadante contendo o DNA. O sobrenadante foi depositado em um microtubo contendo 900  $\mu\text{L}$  de água destilada e 100  $\mu\text{L}$  da solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 5% e submetido à nova centrifugação por 2 minutos a 13.000 rpm para precipitação do DNA.

Para purificação do material extraído o sobrenadante foi desprezado e 300  $\mu\text{L}$  de cloreto de sódio 1,2 M ( $\text{NaCl}_2$ ) foi adicionado ao microtubo. O precipitado de DNA foi totalmente diluído na solução salina e 750  $\mu\text{L}$  de etanol 95% foram acrescentados. Após nova precipitação do DNA, o material foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante desprezado e à amostra 1 mL de etanol 70% foi adicionado para a última etapa de purificação. Após nova centrifugação (2 min/13.000 rpm), o sobrenadante foi descartado e 100  $\mu\text{L}$  de água destilada foi acrescida ao microtubo. O DNA previamente diluído foi incubado a 65 °C por 10 min para posterior leitura de concentração em espectrofotômetro (UltraSpec III, Pharmacia Biothech, Uppsala, Suécia), sua concentração foi ajustada para 100  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ . A pureza do DNA (determinada pela razão A260/A280) foi considerada adequada entre 1.5 e 1.8.

#### 4.4.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Foram genotipados três polimorfismos de base única (Single-nucleotide polymorphisms - SNPs) do gene do VEGF utilizando protocolos previamente descritos (PAPAZOGLU *et al.*, 2004a, 2004b; HSIEH *et al.*, 2004) com pequenas modificações. As amplificações de três regiões do gene do VEGF contendo os polimorfismos -460C/T, -634G/C e 936C/T foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient; Eppendorf, Hamburg, Germany).

##### 4.4.2.1 Ciclagem de temperatura para detecção do polimorfismo -460C/T

Os microtubos contendo: 2,5 µL tampão de reação 10X, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada nucleotídeo, 1 unidade Taq polimerase, 100 ng de DNA e 20 pmol dos *primers sense*: 5'- TGT GCG TGT GGG GTT GAG CG - 3' e *anti-sense* 5'- TAC GTG CGG ACA GGG CCT GA 3' foram submetidos a um termociclador ajustando-se os seguintes parâmetros: ciclo inicial de denaturação a 94 °C por 5 minutos e 35 ciclos de: 94 °C por 20 segundos para denaturação, 63 °C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72 °C por 20 segundos para polimerização e uma ciclagem de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Um fragmento de 175pb foi identificado como produto final em gel de agarose a 2% (condições da eletroforese: 90 volts, 40 minutos) corado com 0,75 µg/mL de brometo de etídio.

##### 4.4.2.2 Ciclagem de temperatura para detecção do polimorfismo -634C/G

Com procedimentos similares aos descritos para a detecção do polimorfismo -634C/G, os microtubos contendo o tampão de reação, o MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq polimerase, 100 ng de DNA, 0,2 mM de cada nucleotídeo e 20 pmol dos *primers sense*: 5'- ATT TAT TTT TGC TTG CCA TT - 3' e *anti-sense*: 5' GTC TGT CTG TCT GTC CGT CA 3' foram submetidos ao termociclador com os seguintes parâmetros de reação: um ciclo inicial a 94 °C por 5 min. e 40 ciclos de: 94 °C por 5 min. para denaturação, anelamento a

49 °C por 1 min. e polimerização a 72 °C por 10 min. Como produto final foi identificado um fragmento de 304pb em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

#### **4.4.2.3 Ciclagem de temperatura para detecção do polimorfismo 936C/T**

De protocolo semelhante aos descritos anteriormente, a detecção do polimorfismo 936C/T incluiu a adição do tampão de reação, MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada nucleotídeo, Taq polimerase e 100 ng de DNA a 20 pmol dos *primers* 5'- AAG GAA GAG GAG ACT CTG CGC AGA GC 3' e *anti-sense*: 5' TAA ATG TAT GTA TGT GGG TGG GTG TGT CTA CAG 3'. Estes foram então submetidos a um termociclador ajustado como segue: um ciclo inicial de denaturação a 94 °C por 5 min e 35 ciclos de denaturação a 94 °C por 40 s, de anelamento a 64 °C por 1 min e de polimerização a 72 °C por 5 min. Como produto final foi identificado um fragmento de 208pb em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Em todos os protocolos de detecção de polimorfismo acima descritos incluiu-se como controle negativo, 2 µL de *Nuclease Free Water* em substituição ao DNA.

#### **4.4.3 Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)**

Os produtos de PCR foram submetidos à reação Polimorfismo do Comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) com enzima de restrição.

##### **4.4.3.1 Identificação do polimorfismo -460C/T**

Para detecção do polimorfismo -460C/T o produto de PCR foi incubado a 65 °C por 16 horas com 1 unidade da endonuclease de restrição BstUI (New England Biolabs, Uniscience, Brasil). Após a digestão enzimática, os produtos foram adicionados em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese (90 volts por

40 minutos). Encontramos os seguintes genótipos: homozigoto de T (175pb), homozigoto de C (155pb e 55pb) e o heterozigoto C/T (175pb, 155pb e 20pb).

#### **4.4.3.2 Identificação do polimorfismo -634C/G**

O polimorfismo -634C/G foi detectado com auxílio da endonuclease BsmFI (New England Biolabs, Uniscience Brasil). Os produtos de PCR foram incubados por três horas a 65 °C com 1 U da enzima. Após a digestão enzimática, os produtos foram adicionados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese (90 volts por 40 minutos), onde os seguintes genótipos foram identificados: homozigoto de C (304pb), homozigoto de G (193pb e 111pb) e o heterozigoto C/G (304pb, 193pb e 111pb).

#### **4.4.3.3 Identificação do polimorfismo 936C/T**

Para detecção do polimorfismo 936C/T o produto de PCR foi incubado a 37 °C por 16 horas com 1 U da endonuclease de restrição NlaIII (New England Biolabs, Uniscience, Brasil). Após a digestão enzimática, os produtos foram adicionados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese (90 volts por 40 minutos) e os genótipos encontrados foram: homozigoto de C (208pb), homozigoto de T (122pb e 86pb) e o heterozigoto C/T (208pb, 122pb e 86pb).

Após a eletroforese, as imagens dos géis de agarose foram capturadas e analisadas usando o G:Box (Syngene) e os softwares da Syngene GeneSnap.

#### 4.5 Análise Estatística

O teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi realizado em todos os grupos estudados, calculando-se as frequências esperadas para cada genótipo e comparando-as com os valores observados.

Diferenças na frequência genotípica do VEGF entre os grupos controle e de estudo foram analisadas pelo teste  $\chi^2$ , valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

O *odds ratio* (OR) ou ‘razão das chances’ é uma estimativa do risco relativo através da comparação das frequências de ocorrência de um evento no grupo de interesse e seu controle. Ele foi aqui utilizado como uma medida de força da associação entre a frequência alélica dos grupos de estudo (quanto maior o *odds ratio* maior a associação entre o fator estudado e a ocorrência do evento, inversamente, *odds ratio* menor que 1, pode indicar que o fator estudado é um fator protetor em relação à ocorrência do evento). Toda análise estatística foi realizada com o software SPSS para as Ciências Sociais, v13.1 *for Windows*.

*Resultados*

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características das Amostras

Dados gerais sobre as características das amostras pertencentes aos grupos de estudo estão compilados na **Tabela 2**.

#### *Grupo IA - Normoglicêmicas*

Foram selecionadas para participar do estudo 40 mulheres atendidas no Serviço de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, que não apresentaram nenhuma alteração glicêmica durante o período gestacional. Destas, 08 amostras foram excluídas devido à concentração e pureza inadequadas após extração do DNA. Assim, 32 mulheres foram incluídas no grupo de gestantes normoglicêmicas. Os testes glicêmicos realizados para triagem das gestantes, não apresentaram alterações nos resultados, nem na dosagem sérica de glicose referente ao período de jejum nem nas dosagens séricas após alimentação; estas variaram de 80 a 102 mg/dL.

A idade das pacientes variou de 20 a 40 anos, com média de 30,2. O peso pré-gestacional variou de 57 a 84 quilos, com média de 63,7 e o peso gestacional no momento do parto, variou de 64 a 95 quilos, com média de 75,9.

Setenta por cento dos partos foram cesarianas, com idade gestacional entre 37 a 41 semanas de gestação, sendo a média de 38 semanas de gestação. Os recém-nascidos apresentaram peso de 2200 a 4400 gramas, com média de 3400 gramas e altura uterina no intervalo de 35 a 42 cm, com média de 38,3 cm.

#### *Grupo IB – Hiperglicêmica Moderada*

Vinte e cinco mulheres atendidas no Serviço de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP apresentaram TTG100g normal e picos de hiperglicemia ao longo do dia, diagnosticados pelo PG alterado. Destas, 4 amostras

foram excluídas devido à concentração e pureza inadequadas após extração do DNA. Assim, 21 mulheres foram incluídas no grupo de gestantes com hiperglicemia moderada. Os testes glicêmicos realizados para triagem destas gestantes, mostraram valores normais para as dosagens glicêmicas de jejum com média de 82 mg/dL, mas com valores alterados nas dosagens pós-brandiais realizadas na seqüência; estas dosagens variaram de 78 a 180 mg/dL de glicose na primeira dosagem, de 87 a 220 mg/dL na segunda dosagem e de 89 a 120 mg/dL na 3ª dosagem.

A idade das pacientes variou de 33 a 42 anos, com média de 38. O peso pré-gestacional variou de 49 a 76 quilos, com média de 60 e o peso gestacional no momento do parto, variou de 60 a 86 quilos, com média de 71.

Noventa por cento dos partos foram cesarianas, com idade gestacional variando entre 37 a 41 semanas de gestação, com média de 38 semanas de gestação. Os recém-nascidos apresentaram peso de 2100 a 4080 gramas, com média de 3040 gramas e altura no intervalo de 37 a 43 cm, com média de 39 cm.

### ***Grupo IIB - Diabéticas clínicas***

Foram selecionadas 40 mulheres atendidas no Serviço de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, que apresentavam diabetes antes do período gestacional. Destas, 3 amostras foram excluídas devido à concentração e pureza inadequadas após extração do DNA. Desta forma, 37 mulheres foram incluídas no grupo de gestantes com diabete clínica. Estas gestantes foram regularmente monitoradas e tiveram a glicemia controlada até o momento do parto. Os testes glicêmicos realizados para triagem destas pacientes apresentaram no período de jejum valores variando de 70 a 199 mg/dL. As dosagens pós-prandiais também apresentaram alterações: média de 191 mg/dL na 1ª dosagem, média de 181 mg/dL na 2ª dosagem e média de 136 mg/dL na 3ª dosagem. A idade das pacientes variou de 18 a 46 anos, com média de 31. O peso pré-gestacional variou de 51 a 98 quilos, com média de 65 e o peso gestacional no momento do parto, variou de 59 a 97 quilos, com média de 76.

Noventa por cento dos partos foram cesarianas, com idade gestacional variando de 37 a 41 semanas de gestação, com média de 38 semanas de gestação. Os recém-



nascidos apresentaram peso de 2900 a 4600 gramas, com média de 3900 gramas e altura uterina no intervalo de 36 a 42 cm, com média de 38,9 cm.

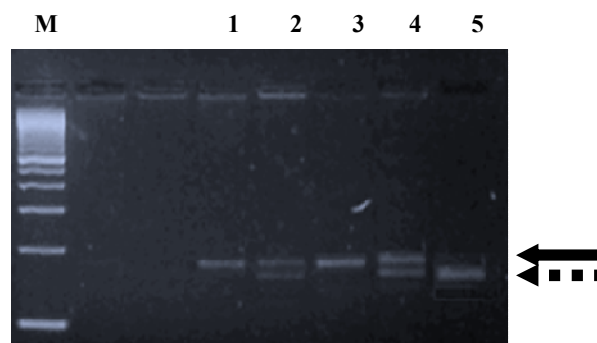
**Tabela 2** - Características da amostra estudada

Grupos estudados	<i>n</i>	Idade materna (anos)	Gestação (semanas)	Peso gestacional (kg)	Peso no parto (kg)	Peso RN (g)	Altura uterina (cm)	Parto cesariana (%)
IA	32	20-40	37-41	57-84	64-95	2,2-3,4	35-42	70
		$\bar{x}=30,2$	$\bar{x}=38$	$\bar{x}=63,7$	$\bar{x}=75,9$	$\bar{x}=3,4$	$\bar{x}=38,3$	
IB	21	33-42	37-41	49-76	60-86	2,1-4,08	37-43	90
		$\bar{x}=38$	$\bar{x}=38$	$\bar{x}=60$	$\bar{x}=71$	$\bar{x}=3,04$	$\bar{x}=39$	
IIB	37	18-46	31-41	51-98	59-97	2,9-4,6	36-42	90
		$\bar{x}=31$	$\bar{x}=38$	$\bar{x}=65$	$\bar{x}=76$	$\bar{x}=3,9$	$\bar{x}=38,9$	

IA - Normoglicêmicas; IB - Hiperglicêmicas Moderada; IIB - Diabéticas Clínicas;  $\bar{x}$ = Média

## 5.2 Amplificação do gene do VEGF para análise do polimorfismo -460C/T

Utilizando a endonuclease de restrição BstUI para digestão enzimática das amplificações obtidas com a reação PCR, foram encontrados os seguintes genótipos: homozigoto de T (175pb), homozigoto de C (155pb e 55pb) e o heterozigoto C/T (175pb, 155pb e 20pb), como demonstrado na **Figura 2**.



**Figura 2** - Gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio. Genótipos após digestão enzimática (BstUI). Na coluna M temos o marcador de 50pb (DNA Ladder). Colunas 1 e 3: genótipo TT - fragmento de 175pb (seta contínua). Colunas 2 e 4: genótipo CT - fragmentos de 175pb (seta contínua) e 155pb (seta tracejada). Coluna 5: genótipo CC - fragmento de 155pb (seta tracejada).

### 5.2.1 Análise do polimorfismo -460C/T do gene do VEGF

A distribuição das freqüências do polimorfismo VEGF **-460C/T** estava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nos grupos estudados: controle (grupo IA) (CC 25%; CT 62,5%; TT 12,5%), diabética clínica (CC 51%; CT 37,8%; TT 10,8%) e hiperglicêmica moderada (CC 9,5%; CT 57,1%; TT 33,3%), conforme detalhado nas **Tabelas 3 a 5**.

Não foi observada diferença significativa em relação à freqüência genotípica entre os grupos IA -gestante normoglicêmica e os grupos IB - gestante hiperglicêmica moderada ( $p=0,11$ ) e IIB - gestante diabética clínica ( $p=0,07$ ) para o polimorfismo de base única (SNP) **-460C/T** do gene do VEGF (**Tabelas 3-4**). Por outro lado, foi observada diferença significativa ( $p=0,003$ , **Tabela 5**) quando comparados os grupos com alterações glicêmicas entre si: diabética clínica (IIB) e hiperglicêmica moderada (IB).

A distribuição das freqüências do polimorfismo VEGF **-460C/T** estava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nos grupos estudados: controle (CC 25%; CT 62,5%; TT 12,5%), diabética clínica (CC 51%; CT 37,8%; TT 10,8%) e hiperglicêmica moderada (CC 9,5%; CT 57,1%; TT 33,3%), conforme detalhado nas **Tabelas 3 a 5**.

Não se observou diferenças estatisticamente diferentes em relação à freqüência genotípica entre os grupos IA -gestante normoglicêmica e os grupos IB - gestante hiperglicêmica moderada ( $p=0,11$ ) e IIB - gestante diabética clínica ( $p=0,07$ ) para o polimorfismo de base única (SNP) **-460C/T** do gene do VEGF (**Tabelas 3-4**). Diferenças significativas ( $p=0,003$ , **Tabela 5**) foram encontradas apenas quando comparados os grupos com alterações glicêmicas entre si: diabética clínica (IIB) e hiperglicêmica moderada (IB).

**Tabela 3** - Freqüências genotípicas do gene VEGF quanto ao polimorfismo -460C/T observadas nos grupos controle e hiperglicemia moderada

<i>Genótipo</i>	<i>Controle</i>	<i>Hiperglicemia</i>	<i>P</i>
<b>-460C/T</b>	<i>n</i> = 32	<i>n</i> = 21	
CC	8 (25,0%)	2 (9,5%)	0,11
CT	20 (62,5%)	12 (57,1%)	
TT	4 (12,5%)	7 (33,3%)	

**Tabela 4** – Frequências genótípicas do gene VEGF quanto ao polimorfismo -460C/T observadas nos grupos controle e diabetes clínica

<i>Genótipo</i>	<i>Controle</i>	<i>Diabete clínica</i>	<i>P</i>
<b>-460C/T</b>	<i>n</i> = 32	<i>n</i> = 37	
CC	8 (25,0%)	19 (51,3%)	0,07
CT	20 (62,5%)	14 (37,8%)	
TT	4 (12,5%)	4 (10,8%)	

**Tabela 5** – Frequências genótípicas do gene VEGF quanto ao polimorfismo -460C/T observadas entre os grupos hiperglicêmicos

<i>Genótipo</i>	<i>Hiperglicemia</i>	<i>Diabete clínica</i>	<i>P</i>
<b>-460C/T</b>	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 37	
CC	2 (9,5%)	19 (51,3%)	0,003
CT	12 (57,1%)	14 (37,8%)	
TT	7 (33,3%)	4 (10,8%)	

A análise das frequências alélicas não mostrou diferenças significativas entre os grupos IB - gestante hiperglicêmica moderada e o grupo IA - controle (**Tabela 6**,  $p=0,07$ , OR = 2,089; 95% (IC) = 0,943-4,627) nem entre o grupo IIB - gestante diabética clínica e o controle - IA ( $p=0,11$ , OR=0,54, **Tabela 7**). em relação a este polimorfismo. Foi detectada diferença significativa apenas entre os grupos hiperglicêmicos entre si (**Tabela 8**,  $p=0,0009$ ).

**Tabela 6** – Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -460C/T nos grupos controle e hiperglicemia moderada

<i>Alelo</i>	<i>Controle</i>	<i>Hiperglicemia</i>	<i>P</i>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>-460C/T</b>				
C	36 (56.3%)	16 (38.1%)	0,07	2,089 (0,943-4,627)
T	28 (43.7%)	26 (61.9%)		

**Tabela 7** – Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -460C/T nos grupos controle e diabetes clínica

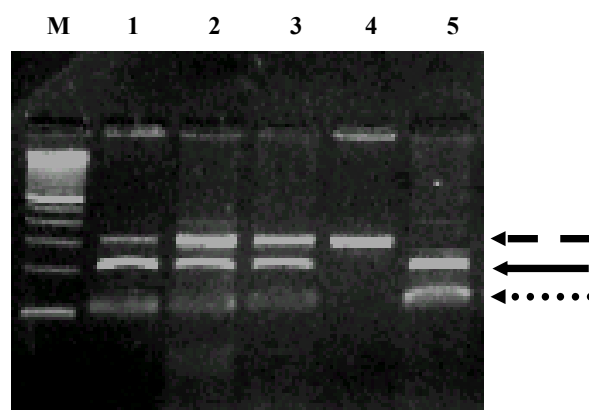
<i>Alelo</i>	<i>Controle</i>	<i>Diabete clínica</i>	<i>P</i>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>-460C/T</b>				
C	36 (56.3%)	52 (70.3%)	0,11	0,54 (0,27-1,09)
T	28 (43.7%)	22 (29.7%)		

**Tabela 8** – Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -460C/T nos grupos hiperglicêmicos

<i>Alelo</i>	<i>Hiperglicemia</i>	<i>Diabete clínica</i>	<i>P</i>	<b>OR (IC 95%)</b>
<i>-460C/T</i>				
<b>C</b>	16 (38.1%)	52 (70.3%)	0,0009	0,26 (0,11-0,57)
<b>T</b>	26 (61.9%)	22 (29.7%)		

### 5.3 Amplificação do gene do VEGF para análise do polimorfismo -634C/G

Com a endonuclease de restrição BsmFI para digestão enzimática das amplificações obtidas com a reação PCR, foram encontrados os seguintes genótipos: homozigoto de C (304pb), homozigoto de G (193pb e 111pb) e o heterozigoto C/G (304pb, 193pb e 111pb) (**Figura 3**).



**Figura 3** Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Genótipos após digestão enzimática (BsmFI). Na coluna M temos o marcador de 100pb (DNA Ladder). Colunas 1, 2 e 3: genótipo CG - fragmento de 304pb (seta tracejada), 193pb (seta contínua) e 111pb (seta pontilhada). Coluna 4: genótipo CC - fragmento de 304pb (seta tracejada). Coluna 5: genótipo GG - fragmentos de 193 (seta contínua) e 111pb (seta pontilhada).

#### 5.3.1 Análise do polimorfismo -634C/G do gene do VEGF

As distribuições genotípicas do polimorfismo VEGF **-634C/G** mostraram-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em todos os grupos estudados (controle-CC 15,6%, CG 56,2%, GG 28,1%; hiperglicemia moderada CC 47,6%, CG 33,3%, GC 19%; diabete

clínica CC 51,3%, CG 40,5%, GG 40,5%). Os resultados obtidos da frequência genotípica estão resumidos nas **Tabelas 9 a 11**.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação à frequência genotípica entre os grupos hiperglicêmicos IB - gestante hiperglicêmica moderada vs. IIB - gestante diabética ( $p=0,46$ ) para o polimorfismo de base única (SNP) **-634G/C** do gene do VEGF (**Tabela 11**). No entanto, diferenças significativas foram encontradas quando comparados os grupos normoglicêmicas (controle) vs. hiperglicêmicas moderadas (**Tabela 9**,  $p=0,04$ ) e vs. diabéticas clínicas ( $p=0,003$ , **Tabela 10**).

**Tabela 9** – Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634C/G observadas nos grupos controle e hiperglicemia moderada

<b>Genótipo</b>	<b>Controle</b>	<b>Hiperglicemia</b>	<b>P</b>
<b>-634G/C</b>	<i>n</i> = 32	<i>n</i> = 21	
<b>CC</b>	5 (15,6%)	10 (47,6%)	0,04
<b>GC</b>	18 (56,2%)	7 (33,3%)	
<b>GG</b>	9 (28,1%)	4 (19,0%)	

**Tabela 10** – Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634C/G observadas nos grupos controle e diabetes clínica

<b>Genótipo</b>	<b>Controle</b>	<b>Diabete clínica</b>	<b>P</b>
<b>-634G/C</b>	<i>n</i> = 32	<i>n</i> = 37	
<b>CC</b>	5 (15,6%)	19 (51,3%)	0,003
<b>GC</b>	18 (56,2%)	15 (40,5%)	
<b>GG</b>	9 (28,1%)	3 (8,1%)	

**Tabela 11** – Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634C/G observadas entre os grupos com alterações glicêmicas

<b>Genótipo</b>	<b>Hiperglicemia</b>	<b>Diabete clínica</b>	<b>P</b>
<b>-634G/C</b>	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 37	
<b>CC</b>	10 (47,6%)	19 (51,3%)	0,46
<b>GC</b>	7 (33,3%)	15 (40,5%)	
<b>GG</b>	4 (19,0%)	3 (8,1%)	

A análise das frequências alélicas também mostrou diferença significativa entre os grupos controle e hiperglicêmica moderada (**Tabela 12**,  $p=0,05$ ) e entre os grupos controle e diabética clínica (**Tabela 13**,  $p= 0,0011$ ) em relação a este polimorfismo.

Nenhuma diferença, no entanto, foi observada entre os grupos hiperglicêmicos entre si (Tabela 14,  $p=0,41$ ).

**Tabela 12** - Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -634G/C nos grupos controle e hiperglicemia moderada

Alelo	Controle	Hiperglicemia	<i>P</i>	OR (IC 95%)
<b>-634G/C</b>				
C	28 (43.8%)	27 (64.3%)	0,05	0.44 (0.20-0.99)
G	36 (56.2%)	15 (35.7%)		

**Tabela 13** - Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -634G/C nos grupos controle e diabetes clínica

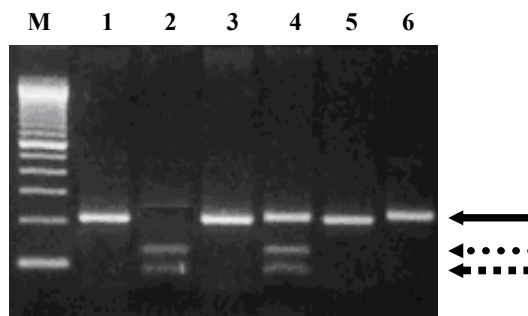
Alelo	Controle	Diabetes clínica	<i>P</i>	OR (IC 95%)
<b>-634G/C</b>				
C	28 (43.8%)	53 (71.6%)	0,0011	0.30 (0.15-0,62)
G	36 (56.2%)	21 (28.4%)		

**Tabela 14** - Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo -634G/C nos grupos com alterações de glicemia

Alelo	Hiperglicemia	Diabetes clínica	<i>P</i>	OR (CI 95%)
<b>-634G/C</b>				
C	27 (64.3%)	53 (71.6%)	0,41	0.71 (0.31-1.6)
G	15 (35.7%)	21 (28.4%)		

#### 5.4 Amplificação do gene do VEGF para análise do polimorfismo 936C/T

Utilizando a endonuclease de restrição NlaIII para digestão enzimática das amplificações obtidas com a reação PCR, foram encontrados os seguintes genótipos: homocigoto de C (208pb), homocigoto de T (122pb e 86pb) e o heterocigoto C/T (208pb, 122pb e 86pb) (Figura 4).



**Figura 4** Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Genótipos após digestão enzimática (NlaIII). Na coluna M temos o marcador de 100pb (DNA Ladder). Coluna 1, 3, 5 e 6: genótipo CC - fragmentos de 208pb (seta contínua). Coluna 4: genótipo CG - fragmentos de 208pb (seta contínua), 122pb (seta pontilhada) e 86pb (seta tracejada). Coluna 2: genótipo TT - fragmentos de 122pb (seta pontilhada) e 86pb (seta tracejada).

#### 5.4.1 Análise do polimorfismo 936C/T do gene do VEGF

As distribuições genotípicas do polimorfismo VEGF **936C/T** mostraram-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em todos os grupos estudados: controle (TT 56,2%; CT 34,4%; CC 9,4%), hiperglicêmica moderada (TT 38,4%; CT 38,4%; CC 0%) e diabética clínica (TT 64,8%; CT 29,7%; CC 5,4%), conforme detalhado nas **Tabelas 15 a 17**.

Não se observou diferença estatisticamente significativa em relação à frequência genotípica entre o grupo controle e os grupos: IB - gestante hiperglicêmica moderada ( $p=0,18$ ) e IIB - gestante diabética ( $p=0,7$ ) para o polimorfismo de base única (SNP) **936C/T** do gene do VEGF (**Tabelas 15 e 16**). Além disso, também não foram encontradas diferenças significativas quando comparados os grupos com alterações glicêmicas entre si: diabética clínica (IIB) e hiperglicêmica moderada (IB) ( $p=0,10$ , **Tabela 17**).

**Tabela 15** – Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo 936C/T observadas em grupo controle e hiperglicemia moderada

Genótipo	Controle	Hiperglicemia	P
<b>936C/T</b>	<i>n</i> = 32	<i>n</i> = 13	
TT	18 (56,2%)	5 (38,4%)	0,18
CT	11 (34,4%)	8 (61,5%)	
CC	3 (9,4%)	0	

**Tabela 16** – Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo 936C/T observadas em grupo controle e diabetes clínica

Genótipo	Controle	Diabetes clínica	<i>P</i>
<b>936C/T</b>	<i>n</i> = 32	<i>n</i> = 37	
TT	18 (56,2%)	24 (64,8%)	0,70
CT	11 (34,4%)	11 (29,7%)	
CC	3 (9,4%)	2 (5,4%)	

**Tabela 17** – Frequências genotípicas do gene de VEGF quanto ao polimorfismo 936C/T observadas em grupos com alterações glicêmicas

Genótipo	Hiperglicemia	Diabetes clínica	<i>P</i>
<b>936C/T</b>	<i>n</i> = 13	<i>n</i> = 37	
TT	5 (38,4%)	24 (64,8%)	0,10
CT	8 (61,5%)	11 (29,7%)	
CC	0	2 (5,4%)	

A análise das frequências alélicas também não mostrou diferenças significativas entre os grupos controle e IB - hiperglicemia moderada ( $p=0,79$ , **Tabela 18**) e IIB – diabetes clínica ( $p=0,42$ , **Tabela 19**), nem entre os grupos com alterações glicêmicas entre si ( $p=0,28$ , **Tabela 20**).

**Tabela 18** – Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo 936C/T nos grupos controle e hiperglicemia moderada

Alelo	Controle	Hiperglicemia	<i>P</i>	OR (IC 95%)
<b>936C/T</b>				
T	47 (73.4%)	18 (69.2%)	0,79	1.23 (0.45-3.34)
C	17 (26.6%)	8 (30.8%)		

**Tabela 19** – Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo 936C/T nos grupos controle e diabetes clínica

Alelo	Controle	Diabetes clínica	<i>P</i>	OR (IC 95%)
<b>936C/T</b>				
T	47 (73.4%)	59 (79.7%)	0,42	0.7 (0.31-1.55)
C	17 (26.6%)	15 (20.3%)		



**Tabela 20** – Frequências alélicas do gene VEGF em relação ao polimorfismo 936C/T entre os grupos com alterações glicêmicas

<b>Alelo</b>	<b>Hiperglicemia</b>	<b>Diabete clínica</b>	<b><i>P</i></b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>936C/T</b>				
<b>T</b>	18 (69.2%)	59 (79.7%)	0,28	0.57 (0.2-1.56)
<b>C</b>	8 (30.8%)	15 (20.3%)		

*Discussão*

## 6 DISCUSSÃO

Alterações vasculares são frequentemente associadas à hiperglicemia. Em retinopatias e comprometimentos renais associados ao diabetes observou-se distúrbios na proliferação endotelial, no crescimento vascular, enfraquecimento da parede capilar com dilatação e rompimento, aumento da produção de matriz extracelular e a formação de micro-aneurismas, hemorragias, edema e microtrombos (NERLICH e SCHLEICHER, 1991; ROY *et al.*, 1994; MAYHEW *et al.*, 2004; KHAN e CHAKRABARTI, 2007).

Na placenta, estas alterações envolvidas com o quadro de hiperglicemia crônica peculiar do *Diabete mellitus* também estão presentes, embora adaptações vaso-proliferativas não tenham sido observadas. As complicações vasculares placentárias desta forma parecem estar relacionadas principalmente à morfologia dos vasos, após a vasculogênese ter ocorrido (BABAWALE *et al.*, 2000).

As placentas das gestantes com hiperglicemia moderada também têm um padrão de vascularização alterado e semelhante ao observado nas placentas de mulheres diabéticas. No entanto, os vasos placentários apresentam maior densidade absoluta (DEL NERO *et al.*, 2002) e maior incidência de endoartrite (LIMA, 1998), além de um maior número de vilosidades e vasos dos vilos terminais (CALDERON, 2003, 2007; PIETRO, 2008), o que indica atividade vaso-proliferativa. Estes achados sugerem um aumento da superfície de trocas materno-fetal e adaptações funcionais que podem estar correlacionadas a um adequado aporte de oxigênio para o feto (CALDERON *et al.*, 2007).

Muitos são os fatores angiogênicos responsáveis pelo crescimento da vascularização, no entanto na placenta e dentre eles, especial atenção tem sido dada ao VEGF. Este fator é capaz de promover a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais e atuar na organização destas células em tubos com lúmen (SOTILLE, 2004). Na placenta humana o VEGF está envolvido com a vascularização da árvore vilosa durante o primeiro trimestre da gestação e no termo, na manutenção da integridade e permeabilidade vascular. Além das células endoteliais e musculares vasculares, na placenta o VEGF é também produzido pelo trofoblasto (citotrofoblasto viloso e trofoblasto extraviloso) e células de Hofbauer (SHERER e ABULAFIA, 2001). Evidências também apontam para uma função autócrina do VEGF secretado pelo

trofoblasto além da sua ação parácrina. Desta forma, além de agir no remodelamento e permeabilidade da micro-circulação uterina e na formação de vasos fetais nos vilos placentários, aumentando as trocas gasosas materno/fetal, o VEGF parece exercer também uma função trófica sobre a fisiologia das próprias células trofoblásticas (SHER e ABULAFIA, 2001).

Assim, considerando o relevante papel desempenhado pelo VEGF na vascularização placentária e a possibilidade de que alterações específicas neste gene possam influenciar a resposta da placenta à hiperglicemia materna, este estudo investigou uma possível correlação entre a presença dos polimorfismos -460C/T, -634C/G e 936C/T do gene do VEGF e a ocorrência de distúrbios hiperglicêmicos gestacionais.

Duas formas de distúrbio hiperglicêmico foram aqui estudadas: hiperglicemia leve ou moderada (grupo IB) e diabetes clínica (grupo IIB), caracterizada como *Diabete mellitus* instalada previamente à gestação. A seleção das amostras destes grupos foi baseada nas análises médico-laboratoriais realizadas no Serviço de Diabetes e Gravidez da Disciplina de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. Só foram incluídas amostras nestes grupos com diagnóstico confirmado e sobre as quais não pairavam dúvidas quanto ao diagnóstico. Por outro lado, o grupo controle foi selecionado a partir de gestantes que comprovadamente não apresentavam alteração de glicemia em nenhum dos testes realizados e que não tinham histórico familiar de doenças associadas à glicemia, hipertensão ou obesidade. Para os parâmetros de peso da gestante, peso do recém nascido, idade da participante, idade gestacional, altura uterina não foram inseridas restrições específicas. Da mesma forma em relação à etnia. As amostras não foram selecionadas em função dos componentes raciais possíveis, levando-se em consideração que a população que utiliza o Serviço de Diabetes e Gravidez da FM-Botucatu, assim como a população brasileira de modo geral apresenta alto índice de miscigenação (SANTOS e MAIO, 2004). Neste contexto, partimos da premissa que a seleção de grupos étnicos específicos não seria devidamente representativo. Por outro lado, a incidência de hiperglicemia leve no Serviço de Diabetes é relativamente baixa; assim a re-seleção de etnias certamente invalidaria numericamente este estudo.

Verificamos também que as frequências genotípicas observadas nos grupos de gestantes normoglicêmicas, com hiperglicemia leve e diabetes clínica selecionados para

representar nossa população estavam em equilíbrio com as esperadas em todos os polimorfismos estudados a partir do teste de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Neste estudo utilizou-se a análise das frequências alélicas e genotípicas para a correlação entre polimorfismos do VEGF placentário e alterações glicêmicas maternas em relação ao grupo controle. Neste contexto, observam-se associações possíveis com os quadros de hiperglicemia materna e a presença dos polimorfismos -460C/T e -634C/G.

Com o universo amostral utilizado não observamos correlações relevantes entre o polimorfismo -460C/T do gene do VEGF e as condições de hiperglicemia materna, seja ela moderada ou caracterizada como diabetes clínica em relação às amostras do grupo normoglicêmico. No entanto, correlações foram detectadas entre os grupos com glicemia alterada. O grupo diabético clínico claramente mostra padrões próprios com uma maior frequência do alelo C, ao contrário dos demais (normoglicêmico e hiperglicemia moderada) que expressam o alelo T predominantemente.

Em relação à presença deste polimorfismo no grupo diabetes clínico nossos achados corroboram a literatura. Ray e colaboradores (2004) mostrou a correlação entre o polimorfismo genético na posição -460C/T e a maior frequência do alelo C no gene do VEGF à condição hiperglicêmica presente na retinopatia diabética proliferativa. A presença deste polimorfismo nestes casos foi diretamente relacionada à atividade da região promotora do VEGF e à sua expressão gênica e protéica. Do ponto de vista funcional, entretanto, não podemos correlacionar nossos achados. Na diabetes clínica a presença de VEGF na placenta (CALDERON *et al.*, 2007; PIETRO, 2008) não parece estar associada ao crescimento vascular. Morfologicamente os vilos coriônicos não apresentam vascularização bastante exígua em relação às vilos de gestantes com hiperglicemia moderada (CALDERON *et al.*, 2007; PIETRO, 2008).

Embora esta possa ser uma inferência contrária à observada na literatura, não podemos deixar de considerar outros fatores associados, como por exemplo, os receptores de VEGF que podem também modular positivamente ou negativamente o crescimento e a fisiologia vascular na presença de VEGF.

Em relação ao polimorfismo -634C/G do gene do VEGF correlações significativas foram encontradas nas frequências genotípicas e alélicas com as condições hiperglicêmicas analisadas: hiperglicemia e diabetes em relação ao controle normoglicêmico. O padrão de distribuição alélica claramente mostra um predomínio do

alelo C e do genótipo CC nos grupo hiperglicêmicos. Estes resultados sugerem que o polimorfismo -634C/G placentário possa estar relacionado à resposta da vascularização placentária face às alterações glicêmicas na interface materno-fetal. No entanto, não distingue as duas patologias entre si, nem mesmo permite a correlação com achados morfológicos, que são essencialmente diferentes nestas duas condições clínicas.

Particularmente o polimorfismo -634C/G tem sido significativamente correlacionado à produção de VEGF (WATSON *et al.*, 2000). No entanto, estas correlações funcionais necessitam ainda ser estudadas mais profundamente uma vez que os níveis de VEGF foram maiores em indivíduos com genótipo GG nos estudos de Watson e colaboradores (2000), mas associado ao genótipo CC em outro estudo (AWATA *et al.*, 2002). Embora também tenhamos encontrado um genótipo CC prevalente em relação a este polimorfismo, a presença ou ausência de VEGF nas vilosidades coriônicas não poderia explicar padrões vasoproliferativos na placenta das gestantes com hiperglicemia moderada e ao mesmo tempo restrição de crescimento vascular na placenta diabética. Desta forma, esta associação pode estar envolvida com outros fatores de resposta da vasculatura placentária à presença de um meio hiperglicêmico, mas não aos padrões angiogênicos observados conforme nossa hipótese inicial de estudo.

Para o polimorfismo 936C/T níveis baixos de VEGF foram correlacionados à expressão diferencial do alelo T (RENNER *et al.*, 2000). Neste estudo, não encontramos alterações significativas do padrão de distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 936C/T, o que talvez seja mais um indicativo da presença de VEGF nas placentas com distúrbios glicêmicos.

Em conjunto, nossos achados sugerem que a resposta placentária a distúrbios hiperglicêmicos pode estar correlacionada à presença dos dois polimorfismos: -460C/T e 634C/G. No entanto, nenhuma correlação direta funcional positiva foi observada com a angiogênese observada nas placentas de gestações associadas à hiperglicemia moderada.

Finalmente, algumas outras considerações se fazem necessárias para a validação dos nossos resultados, como o tamanho amostral. Para se testar a associação entre uma variação de DNA e uma determinada alteração funcional o número de indivíduos incluídos no estudo deve ser influenciada pela frequência do polimorfismo na população. Amostras maiores melhorariam a análise dos nossos resultados. Estamos conscientes da

reduzida dimensão de nosso universo amostral determinadas pelas dificuldades na obtenção dos casos (baixa casuística da condição hiperglicemia moderada), pelo o custo financeiro e pelo tempo necessário para a execução dos exames laboratoriais. Desta forma, consideramos nossos resultados sugestivos, sabendo que estes precisam ser confirmados em amostras maiores, testando também outros polimorfismos relativos ao VEGF e seus receptores. Isto sem dúvida poderia levar a uma melhor compreensão da participação da família VEGF na modificação placentária de gestantes com distúrbios hiperglicêmicos.

*Conclusões*



## 7 CONCLUSÕES

Concluimos através de nossos dados que:

- Houve associações entre os polimorfismos -460C/T e 634C/G em gestantes com distúrbios hiperglicêmicos.
- Não houve correlação direta funcional positiva entre os polimorfismos estudados e a angiogênese observada nas placentas de gestações associadas à hiperglicemia moderada.

## *Referências Bibliográficas*

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

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

BATES, D.O.; HARPER, D.J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascul. Pharmacol.**, v. 39, p. 225-237, 2002.

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

BOOTLE-WILBRAHAM, C.A.; TAZZYMAN, S.; THOMPSON, W.D.; STIRK, C.M.; LEWIS, C.E. Fibrin fragment E stimulates the proliferation, migration and differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro. **Angiogenesis**, v. 4, p. 269-275, 2001.

BROCK, D.R.; DVORAK, H.F.; SENGER, D.R. Tumor secreted vascular permeability factor increases cytosolic  $Ca^{2+}$  and von Willebrand factor release in human endothelial cells. **Am. J. Pathol.**, v. 1338, p. 213-221, 1991.

CALDERON, I.M.P. **Estudo morfométrico de vilosidade placentária relacionado a níveis glicêmicos e dopplervelocimetria da artéria umbilical em gestações complicadas por hiperglicemia diária ou diabetes gestacional ou clínico. Botucatu (SP). Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.**

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

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

---

\* De acordo com:

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

CLARK, D.E.; SMITH, S.K.; HE, Y.; DAY, K.A.; LICENCE, D.R.; CORPS, A.N. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. **Biol. Reprod.**, v. 59, p: 1540-1548, 1998.

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

COOPER, J.C.; SHARKEY, A.M.; MCLAREN, J.; CHARNOK-JONES, D.S.; SMITH, S.K. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. **J. Reprod. Fert.**, v. 105, p. 2005-2013, 1995.

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

DEMIR, R.; SEVAL, Y.; BERTHOLD, H. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. **Acta Hist.**, v. 109, p. 257-265, 2007.

FAVARD, C.; MOUKADIRI, H.; DOREY, C.; PRALORAN, V.; PLOUET, J. Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. **Bio Cell**, v. 73, p. 1-6, 1991.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 55, p. 15-35, 2000.

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

FERRARA, N.; HOUCK, K.; JAKEMAN, L.; LEUNG D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocrine Rev.**, v. 13, p. 18-32, 2005.

FONG, G.H.; ROSSANT, J.; GERTSENSTEIN, M.; BREITMAN, M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v. 376, p. 66-70, 1995.

GERBER, H.P.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth induces expression of the antiapoptotic, proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 1313-1316, 1998.

GIRNITA, D.M.; WEBBER, S.A.; FERRELL, R.; BURCKART, G.J.; BROOKS, M.M.; McDADE, K.K.; CHINNOCK, R.; CANTER, C.; ADDONIZIO, L.; BERNSTEIN, D.; KIRKLIN, J.K.; GIRNITA, A.L.; ZEEVI, A. Disparate distribution of 16 candidate single nucleotide polymorphisms among racial and ethnic groups of pediatric heart transplant patients. **Transplantation**, v. 82, p. 1774-1780, 2006.

GUSTINCICH, S.; MANFIOLETTI, G.; DEL SAL, G.; SCHNEIDER, C.; CARNINCI, P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1991.

HSIEH, Y.Y.; CHANG, C.C.; TSAI, F.J.; YEH, L.S.; LIN, C.C.; PENG, C.T. T allele for VEGF gene-460 polymorphism at the 5'-untranslated region: association with a higher susceptibility to endometriosis. **J. Reprod. Med.**, v. 49, n. 6, p. 468-472, 2004.

HIRATSUKA, S.; NAKAO, K.; NAKAMURA, K.; KATSUKI, M.; MARU, Y.; SHIBUYA, M. Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. **Mol. Cell Biol.**, v. 25, p. 346-354, 2005.

HOWELL, W.M.; ALI, S.; ROSE-ZENILLI, M.J.; YE, S. VEGF polymorphism and severity of atherosclerosis. **J. Med. Genet.**, v. 42, p. 485-490, 2005.

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

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

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

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

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

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

KLAGSBRUN, T.T.; TAKASHIMA, S.; MAMLUK, R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 515, p. 33-48, 2002.

KROLL, J.; WALTENBERGER, J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR), rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 265, p. 636-699, 1999.

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

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

LIN, J.M.; WAN, L.; TSAI, T.; LIN, H.J.; TSAI, Y.; LEE, C.C.; TSAI, C.H.; TSENG, S.H.; TSAI, F.J. Vascular Endothelial Growth Factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration. **Am. J. Ophthalmol.** 2008. In press.

LYGNOS, M.C.; PAPPA, K.I.; PAPADAKI, H.A.; RELAKIS, C.; KOUMANTAKIS, E.; ANAGNOU, N.P.; ELIOPOULOS, G.D. Changes in maternal plasma levels of VEGF, bFGF, TGF-beta1, ET-1 and sKL during uncomplicated pregnancy, hypertensive pregnancy and gestational diabetes. **In Vivo**, v. 20, p. 157-163, 2006.

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

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

NERLICH, A.G.; SCHLEICHER, E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. **Am. J. Pathol.**, v. 139, p.889-899, 1991.

PAPAZOGLU, D.; GALAZIOS, G.; KOUKOURAKIS, M.I.; KONTOMANOLIS, E.N.; MALTEZOS, E. Association of -634G/C and 936C/T polymorphisms of the vascular endothelial growth factor with spontaneous preterm delivery. **Acta Obst. Gyn. Scand.**, v. 83, p. 461-465, 2004a.

PAPAZOGLU, D.; GALAZIOS, G.; PAPTAEODOROU, K.; LIBERIS, V.; PAPANAS, N.; MALTEZOS, E.; MAROULIS, G.B. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pre-eclampsia. **Mol. Reprod.**, v. 10, p. 321-324, 2004b.

PIETRO, L. **Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na placenta de gestantes com hiperglicemia leve.** 89 f. Tese de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RAY, D.; MISHRA, M.; RALPH, S.; READ, I.; DAVIES, R.; BRENCHLEY, P. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 861-864, 2004.

REGNAULT, T.R.H.; GALA, H.L.; PARKER, T.A.; ANTHONY, R.V. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. **Placenta**, v. 23, p. S119-S129, 2002.

RENNER, W.; KOTSCHAN, S.; HOFFMANN, C.; OBERMAYER-PIETSCH, B.; PILGER, E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. **J. Vasc. Res.**, v. 37, p. 443-448, 2000.

REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 83, p. 151-163, 2002.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; NICO, B.; RIA, R.; DAMMACCO, F. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. **Curr. Mol. Med.**, v. 2, p. 537-543, 2002.

RISAU, W.; LEMMON, V. Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. **Dev. Biol.**, v. 125, p. 441-450, 1998.

ROY, H.; SHALINI, B.; YLA-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS**, v. 580, p. 2879-2887, 2006.

ROY, S.; MAIELLO, M.; LORENZI, M. Increased expression of basement membrane collagen in human diabetic retinopathy. **J. Clin. Invest.**, v.93, p.438-442, 1994.

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

RUDGE, M.V.; PERACOLI, J.C.; BEREZOWSKI, A.T.; CALDERON, I.M.; BRASIL, M.A. The oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycemia during pregnancy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 23, p. 1079-1089, 1990.

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

SANTOS, R.V.; MAIO, M.C. Qual "Retrato do Brasil"? Raça, Biologia, identidades e política na era da genômica. **Mana**, v. 10, p. 61-95, 2004.

SHALABY, F.; ROSSANT, J.; YAMAGUCHI, T.P.; GERTSENSTEIN, M.; WU, X.F.; BREITMAN, M.L. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. **Nature**, v. 376, p. 62-66, 1995.

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

SHARKEY, A.M.; COOPER, J.C.; BALMFORTH, J.R.; MCLAREN, J.; CLARK, D.E.; CHARNOCK-JONES, D.S.; MORRIS, N.H.; SMITH, S.K. Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 26, p. 1182-1185, 1996.

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



SENGER, D.R.; CONNOLLY, D.T.; VAN DE WATER, L.; FEDER, J.; DVORAK, H.F. Purification of guinea pig tumor secreted vascular permeability factor. **Cancer Res.**, v. 50, p. 1774-1778, 1990.

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

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

SHIRAISHI, S.; NAKAGAWA, K.; KINUKAWA, N.; NAKANO, H.; SUEISHI, K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in human placenta. **Placenta**, v. 17, p. 111-121, 1996.

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

STEVENS, A.; SODEN, J.; BRENCHLEY, P.E.; RALPH, S.; RAY, D.W. Haplotype Analysis of the Polymorphic Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Promoter. **Cancer Res.**, v. 63, p. 812-816, 2003.

SUGANTHALAKSHMI, B.; ANAND, R.; KIM, R.; MAHALAKSMI, R.; KARTHIKPRAKASH, S.; NAMPERUMALSAMY, P. Association of VEGF and eNOS gene polymorphism in type 2 diabetic retinopathy. **Mol. Vision**, v. 12, p. 336-341, 2006.

SZETO, C; CHOW, K; POON, P; SZETO, C; SZETO, Y.; WONG, Y.; LI, P. Genetic polymorphism of VEGF: Impact on longitudinal change of peritoneal transport and survival of peritoneal dialysis patients. **Kidney Int.**, v. 65, p. 1947-1955, 2004.

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

VINCENTI, V.; CASSANO, C.; ROCCHI, L. M.; PERSICO, G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. **Circulation**, v. 93, p. 1493-1495, 1996.

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

WATALA, C.; GOLAHSKI, J.; WITTAS, H.; GURBIEL, R.; GWOIDZIFISKI, K.; TROJANOWSKI, Z. The effects of in vivo and in vitro non-enzymatic glycosylation and glycooxidation on physico-chemical properties of haemoglobin in control and diabetic patients. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 28, p. 1343-1403, 1996.

WATHEN, K.A.; TUUTTI, E.; STENMAN, U.H.; ALFTHAN, H.; HALMESMAKI, E.; FINNE, P.; YLIKORKALA, O.; VUORELA, P. Maternal serum-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. **J. Clin. Methods**, v. 91, p. 180-184, 2006.

WATSON, C.J.; WEBB, N.J.; BOTTOMLEY, M.J.; BRENCHLEY, P.E. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. **Cytokine**, v. 12, p. 1232-1235, 2000.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. **Mol. Div.**, v. 10, p. 515-527, 2006.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MUNSTEDT, K.; LANG, U.; LIANG, O. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **Eur. J. Obst. Gyn. Reprod. Biol.**, v. 110, p. S10-S18, 2003.

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