

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM MEDICINA

**FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS DO CORDÃO UMBILICAL DE  
GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPSIA: ESTUDO PILOTO. ANÁLISE  
DOS FATORES INFLAMATÓRIOS.**

Doutorando: Otavio Madi

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes

Co-orientadora: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner

2020

OTAVIO MADI

**FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS DO CORDÃO UMBILICAL DE  
GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPسيا: ESTUDO PILOTO. ANÁLISE  
DOS FATORES INFLAMATÓRIOS.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina da Universidade  
Nove de Julho UNINOVE, como requisito para  
obtenção do título de Doutor em Medicina

Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes

São Paulo

2020

Madi, Otavio.

Fotobiomodulação em células do cordão umbilical de gestantes com pré-eclâmpsia: análise dos fatores inflamatórios. estudo piloto. / Otavio Madi. 2020.

54 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Chavantes.

Co-orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Stella Regina Zamuner.

1. Pré-eclâmpsia. 2. Fotobiomodulação. 3. Laser. 4. Laser de baixa intensidade.

I. Chavantes, Maria Cristina. II. Zamuner, Stella Regina.

III. Titulo

CDU 616



São Paulo 26 de outubro de 2020

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno: **OTÁVIO MADI**

Titulo da tese: **Fotobiomodulação em células do cordão umbilical de gestantes com pré-eclâmpsia: análise dos fatores inflamatórios**

Presidente: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA CHAVANTES

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI

Membro: PROFA. DRA. MARISA PASSARELLI

Membro: PROF. DR. JOSÉ CARLOS PERAÇOLI

Membro: PROFA. DRA. IVANY BAPTISTA

Dedico este trabalho a minha esposa Lila, que direta e indiretamente me apoiou incansavelmente, ao longo de toda a minha carreira e ultimamente nessa empreitada, abdicando de muitos finais de semana e também a minhas filhas Carolina, Virginia e Miriam pelo apoio e incentivo. Dedico ainda a meu tio Paulo Madi (*in memoriam*) que foi grande incentivador para minha carreira profissional e pessoal, que foi exemplo de generosidade e dedicação aos pacientes e aos colegas.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial às pacientes que de modo corajoso e colaborador concordaram em participar desse trabalho, tornando possível esse trabalho.

Agradeço à professora Dra. Maria Cristina Chavantes e agora também, amiga, muito presente, dedicada, paciente, generosa, incansável incentivadora e que valorizou meu trabalho, quando eu mesmo não acreditava.

Agradeço a Profa. Dra. Stella Regina Zamuner, co-orientadora e que além de contribuir na tese, generosamente disponibilizou os laboratórios usados para as avaliações bioquímicas.

A Dra. Luciana Miato Goncalves Silva, farmacêutica, que generosamente se dispôs e realizou os ensaios bioquímicos.

As alunas de graduação da UNINOVE, Camila Moura Rocha de Andrade - Medicina, Maria Luísa de Oliveira Silva - Biomedicina, Ingrid Alves Lucena - Biomedicina, Suan Micaela Alves de Brito - Ciências biológicas,

Aos amigos e companheiros de trabalho na Uninove, Profa. Dra. Luz Marina Gonçalves de Araújo e Prof. Dr. Sérgio Tomaz Schettini, com quem trocamos muitas idéias que muito contribuíram e me incentivaram na realização do trabalho.

Agradecimento aos diretores, professoras Cinthia Duran, Renata Mahfuz Gallotti, Fernanda Colombo, que contribuíram e incentivaram para realização deste trabalho.

Muito obrigado especial aos professores Dr. José Antônio Silva Jr e Dra. Ana Carolina Ratto Horta, por participação na qualificação e fundamental contribuição para o desfecho do trabalho.

Agradeço ainda à Dr. Marcelo Barletta Soares Viterbo, diretor técnico do Conjunto Hospitalar do Mandaqui e Dr. Corintio Mariani Neto, diretor técnico do Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros, que permitiu e autorizou usar as

dependências dos respectivos hospitais, residentes, funcionários e alunos do Internato, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço aos colegas Fernando Zucon e Silva, gerente da Maternidade do Conjunto Hospitalar do Mandaqui, Raquel Grecco Teixeira Ribeiro, Fátima Teresinha da Silva, Gilvan Nascimento de Paula, Juliana de Andrade Carvalho Silva, Marcia Lusía Moraes Alves, do Conjunto Hospitalar do Mandaqui e Dr. Valdir Tadini e Dr. Mauricio Sena, do Hospital Leonor Mendes de Barros, com contribuição definitiva para seleção das pacientes, fundamental para o trabalho.

Agradecimento especial a presença da banca examinadora representada pelos Professores Doutores José Carlos Peraçoli, Ivany Baptista, Marisa Passarelli e Maria Aparecida Dalboni pela contribuição de seus apontamentos e direção futura que o experimento deve seguir.

**Resumo:**

As desordens hipertensivas, incluindo a pré-eclâmpsia (PE), complicam em cerca de 3 a 7% das gestações, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade materna e perinatal no Brasil bem como ao redor do mundo. Hipertensão gestacional (HG) é o aparecimento de hipertensão arterial na segunda metade da gestação e quando a essa condição se soma a proteinúria maior de 300 mg em urina de 24 horas tem-se a pré eclâmpsia (PE). Um defeito na invasão do citotrofoblasto no endométrio provoca vasoconstrição das arteríolas, que chegam a placenta ocasionando um hipofluxo placentário, que libera no sangue de fatores inflamatórios, auto imunes e antiangiogênicos, induzindo a disfunção endotelial. A hipóxia placentária determina restrição do crescimento fetal intra útero. O tratamento definitivo da PE é o parto. O Laser de baixa intensidade (LBI) denota uma potência inferior a 1 Watt, o qual não deve elevar a temperatura acima de 1°C no tecido alvo. Alguns trabalhos de nossa equipe tem demonstrado efeito do LBI na melhora da hipertensão e perfusão de órgãos em humanos, inclusive gestantes hipertensas como também em modelos animais, justificando este nosso trabalho na tentativa de se estabelecer mecanismos de ação para este efeito. Foram coletados segmentos de cordão umbilical de gestantes normotensas e hipertensas e extraídas as células da veia do cordão. Estas células foram separadas e tratadas com laser e foram analisadas as citocinas TNF- $\alpha$  e IL6 por ensaio de ELISA. Objetivo: Avaliar o efeito da fotobiomodulação em células do cordão umbilical de gestantes com pré-eclâmpsia por meio da análise dos fatores inflamatórios. Os resultados evidenciaram incremento de TNF- $\alpha$  e diminuição da IL6 após 60 minutos da aplicação do laser. O efeito da FBMT na processo inflamatório pode ser interpretado com a diminuição dos níveis com IL 6 e incremento dos níveis de TNF- $\alpha$ , 60 minutos após aplicação do laser. A análise dos vários trabalhos do nosso grupo na linha de pesquisa do uso do Laser em indivíduos hipertensos e na gestação nos permite sugerir que a FBMT pode ser um processo capaz de auxiliar nesse combate a hipertensão, necessitando de mais estudos a fim de sinalizar a resposta neste sentido.

Palavras chave: Pré-eclâmpsia, Fotobiomodulação, Laser, células do cordão umbilical gestante, Laser de Baixa Intensidade.



## Abstract

Hypertensive disorders, including preeclampsia (PE), complicate in about 3 to 7% of pregnancies, being the main cause of maternal and perinatal morbidity and mortality in Brazil and worldwide. Gestational hypertension (HG) is the appearance of arterial hypertension in the second half of pregnancy and when this condition is added to proteinuria greater than 300 mg in 24-hour urine, it is possible to assure that there is a pre eclampsia (PE). A defect in the invasion of the cytotrophoblast in the endometrium causes vasoconstriction of the arterioles that reach the placenta causing a placental hypoflow, which releases in the blood several inflammatory, autoimmune and antiangiogenic factors, inducing endothelial dysfunction. Placental hypoxia determines restriction of fetal growth into the uterus. The definitive treatment of PE is childbirth. The Low Level Laser Therapy (LLLT) presents a power lower than 1 Watt as well as it should not raise the temperature above 1°C into the target tissue. Some of our team's studies have demonstrated the LLLT effect in the improvement of hypertension and organ perfusion in humans, including hypertensive pregnant women and animal models, justifying our work in an attempt to establish action mechanisms for this purpose. Umbilical cord segments were collected from normotensive and hypertensive pregnant women and extracted cells from the cord vein. These cells were separated and treated with laser. Then, a right amount of TNF- $\alpha$  and IL6 cytokines were analyzed by ELISA assay. To evaluate the photobiomodulation effect on umbilical cord cells by pregnant women with preeclampsia were analyzing inflammatory factors. The results indicated an increase in TNF- $\alpha$  and a decrease in IL6 following 60 minutes of laser application. **Discussion:** The PBMT results on the inflammatory process can be interpreted with decreased IL 6 levels by 60 minutes post laser irradiation. The various studies analysis of our team in this research field of laser application by hypertensive individuals and pregnancy women, allows us to suggest that PBMT could be an effective weapon against hypertension, requiring more studies in this sense.

Key words: LLLT, low-level laser therapy, PBMT, preeclampsia, human umbilical cord, hypertension.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de Adenosina
bpm	Batimentos por minuto
CTB	Cardiotocografia Basal
CW	<i>Continuous Wave</i>
DC	Débito Cardíaco
DP	Desvio Padrão
DUM	Data da Última Menstruação
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FC	Frequência Cardíaca
FCF	Frequência Cardíaca Fetal
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
hCG	Gonadotrofina Coriônica
HDI	<i>Hypertension Diagnosis Incorporation</i>
HELLP	<i>H = hemolysis; EL = elevated liver enzymes; LP= low platelets</i>
IBM SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
IDO	Indoleamina 2,3-dioxygenase
IL	Interleucinas
IMC	Índice de Massa Corpórea
LAP	Laser de Alta Potência
LBI	Laser de Baixa Intensidade
LED	<i>Light Emission Diode</i>
LLLT	<i>Low-Level Laser Therapy</i>
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mW	MiliWatts
Min (min)	Minuto
nm	Nanômetro
NHBEP	<i>National High Blood Pressure Education Program</i>
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial

PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PCR	Proteína C Reativa
PE	Pré-eclâmpsia
PGE2	Prostaglandina E 2
PIGF-1	<i>Placental Growth Factor</i>
PS	Pronto Socorro
RCIU	Restrição do Crescimento Intra-Uterino
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RVP	Resistência Vascular Periférica
RVS	Resistência Vascular Sistêmica
sFLT-1	<i>FMS-like</i> tirosina cinase-1 solúvel
SHR	<i>Spontaneous Hypertensive Rats</i>
SOD	Superóxido Dismutase
TNF $\alpha$	Fator Necrose Tumoral
USG	Ultrassonografia Obstétrica
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VS	Volume Sanguíneo
$\lambda$ (lambda)	Lambda (comprimento de onda)
RMM	Razão de Morte Materna
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial Saúde)
ISSHP	<i>International society for Study of Hypertension in Pregnancy</i>

## SUMÁRIO

1.	Introdução .....	13
1.1	Classificação da Hipertensão Arterial na Gravidez .....	14
1.2	Etiopatogenia da Pré-eclâmpsia .....	16
1.2.1	Invasão Citotrofoblasto .....	16
1.2.2	Fatores Angiogênicos/Antiangiogênicos - Disfunção Endotelial .....	18
1.3	Disfunção Vascular Sistêmica .....	22
1.4	Intervenções farmacológicas para controle de gestantes portadoras de pré eclâmpsia .....	23
1.5	Laser .....	24
1.6	Efeitos da Laserterapia na Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).....	26
1.7	HUVEC - <i>Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells</i> .....	28
2.	Objetivo .....	29
3.	Material e Métodos .....	30
3.1	Plataforma Brasil - aprovações .....	30
3.2	Conceitos (ACOG, 2013) .....	30
3.3	As células da veia do cordão umbilical .....	31
3.4	Critérios de Inclusão .....	31
3.5	Critérios de não inclusão.....	31
3.6	Coleta do cordão umbilical .....	32
3.7	Extração de Células do Cordão Umbilical .....	32
3.8	Cálculo da dosimetria para Terapia de Fotobiomodulação.....	33
3.9	Terapia com Laser de Baixa Intensidade .....	34
3.10	Análise das citocinas Inflamatórias .....	35
3.11	Análise Estatística .....	36
4.	Resultados .....	37
4.1	Identificação das células do cordão umbilical.....	37
4.2	Comparação entre os grupos .....	37
4.3	Mediadores inflamatórios: TNF- $\alpha$ e IL6 .....	38
5.	Discussão .....	41
6.	Considerações Finais.....	45
7.	Referências .....	46

## 1. Introdução:

As desordens hipertensivas, incluindo a pré-eclâmpsia (PE), complicam em cerca de 3 a 7% das gestações, sendo a principal causa de morbidade-mortalidade materna e perinatal no Brasil e também ao redor do mundo (MORSE, 2011).

A pré-eclâmpsia é uma doença multifatorial e multissistêmica, específica da gestação e que se caracteriza classicamente pela associação de hipertensão arterial e proteinúria, a partir da 20ª semana de gestação. Na ausência de proteinúria também se identifica a pré-eclâmpsia pela manifestação de lesão de órgãos alvo (trombocitopenia, aumento da concentração sérica de transaminases, insuficiência renal, edema pulmonar, distúrbios visuais e/ou cerebrais (ACOG, 2013). Uma vez identificada clinicamente, se não ocorrer o término da gestação, essa doença tende a evoluir para situações de gravidade como eclâmpsia, acidente vascular cerebral hemorrágico, síndrome HELLP, insuficiência renal, edema pulmonar e morte (Amaral et al., 2017).

Em todo o mundo, a pré-eclâmpsia e suas complicações estão entre as principais causas de mortalidade materna (Duley, 2009). Enquanto, a morte materna por pré-eclâmpsia é menos comum nos países desenvolvidos, a taxa de morbidade materna é alta e contribui, principalmente, para as admissões em unidade de terapia intensiva durante a gestação (Duley, 2009; Porreco & Barkey, 2010).

Segundo Boletim do Ministério da Saúde, publicado em 28 de maio de 2020, o Brasil reduziu em 8,4% a razão de mortalidade materna (RMM) no ano de 2018, cuja taxa foi de 59,1 óbitos para cada 100 mil nascidos vivos. Entre os óbitos maternos ocorridos no Brasil, de 1996 a 2018, as causas de morte que se destacaram foram: hipertensão arterial, hemorragia, infecção e aborto, respectivamente em ordem de ocorrência.

## 1.1 Classificação da Hipertensão Arterial na Gravidez

Não há um consenso a respeito da classificação, diagnóstico e condutas das desordens hipertensivas na gestação. Esta falta de consenso dificulta o entendimento das taxas de incidência, das taxas dos desfechos maternos e fetais e também o impacto na fisiopatologia o que certamente atrasa o desenvolvimento de testes preditivos, tratamentos, determinando piora nos desfechos da gestação comprometida. (BROWN, 2018b)

A *International Society for Study of Hypertension in Pregnancy* (ISSHP) classifica as síndromes hipertensivas da gestação em: Hipertensão arterial crônica (hipertensão arterial diagnosticada antes da gravidez ou anteriormente à 20ª semana da gestação), Hipertensão Gestacional (hipertensão arterial que aparece a partir da 20ª semana de gravidez, em gestante previamente normotensa, na ausência de características de pré-eclâmpsia, Pré-eclâmpsia (hipertensão arterial que aparece a partir da 20ª semana de gravidez, em gestante previamente normotensa, associada à proteinúria e/ou lesão de órgão alvo materno) e Pré-eclâmpsia superposta à hipertensão arterial crônica (caracterizada por aparecimento ou piora do valor de proteinúria detectada na primeira metade da gestação na ou ocorrência de lesão de órgãos alvo, como na pré-eclâmpsia ou quando há necessidade de introdução de drogas anti-hipertensivas ou aumento das doses terapêuticas vigentes (AGOG, 2013).

A pré-eclâmpsia também pode ser classificada, segundo a idade gestacional em que se iniciam suas manifestações clínicas, em pré-eclâmpsia precoce ou tardia, ou seja antes ou a partir de 34 semanas, respectivamente. Segundo a literatura, essas duas formas de pré-eclâmpsia têm diferentes etiologias (von DADELSZEN et al., 2003; HUPPERTZ, 2008). Pré-eclâmpsia de início precoce está geralmente associada a defeito do desenvolvimento da placenta e da circulação uteroplacentária, Dopplervelocimetria anormal da artéria uterina, restrição do crescimento fetal e piora dos desfechos maternos e perinatal. (MURPHY, 2000; NESS, 2006). A pré-eclâmpsia de início tardio se associa a síndromes metabólicas, inflamação e disfunção endotelial. Assim, a associação com obesidade e doenças crônicas é comum. A avaliação do compartimento útero placentário está frequentemente dentro do normal ou apresenta pequenas alterações. Os desfechos materno e perinatal são mais favoráveis, principalmente porque as manifestações clínicas acontecem próximas do

termo. Segundo PERAÇOLI et al. (2019), embora a incidência de pré-eclâmpsia precoce é geralmente baixa, no Brasil ocorre em cerca de 40% dos casos de pré-eclâmpsia atendidos nos hospitais terciários.

## 1.2 Etiopatogenia da Pré-eclâmpsia

### 1.2.1 Invasão Citotrofoblasto

Estudos recentes denotam que a etiopatogenia na pré-eclâmpsia, incorre numa falha na invasão do citotrofoblasto e, portanto, as artérias espiraladas, ao invés de se tornarem vasos largos e tortuosos, facilitando o fluxo sanguíneo, permanecem estreitas, resultando em hipoperfusão no leito placentário (Figura 1). (DULEY, 2003; WILLIAMS, 2011)

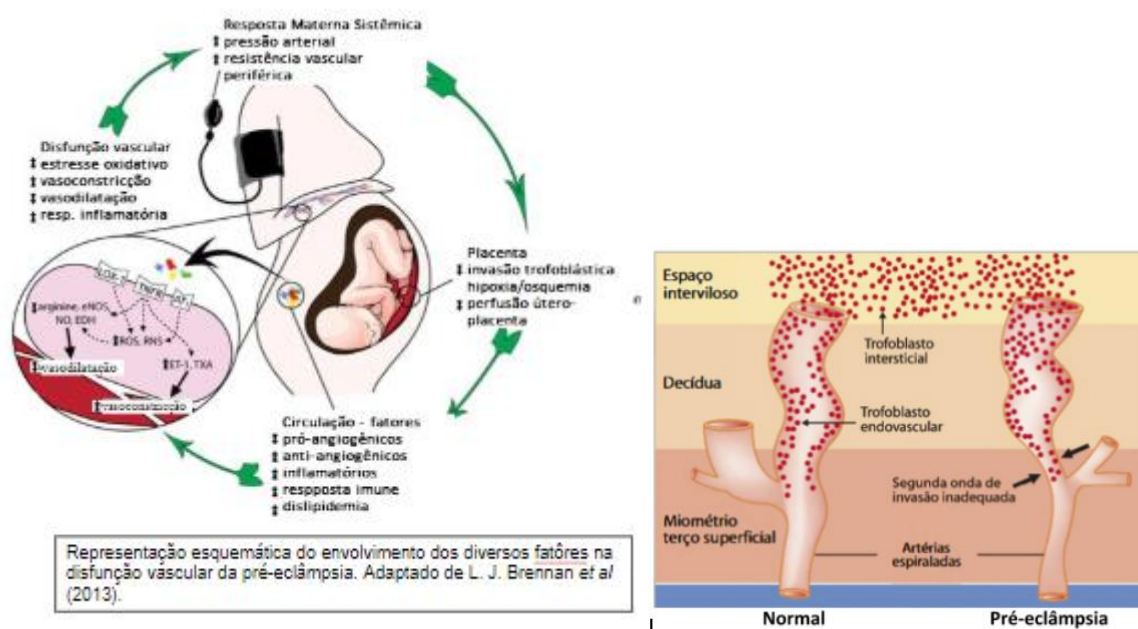


Figura 1: A direita observa-se uma representação da invasão do citotrofoblasto e a esquerda a cascata de eventos que se inicia com a hipóxia placentária.

Em resposta a hipóxia placentária ocorre produção e liberação no sangue de fatores inflamatórios, auto-imunes e antiangiogênicos. Na pré-eclâmpsia observa-se redução de fatores pró-angiogênicos e elevação de anti-angiogênicos, além do incremento da resposta imune e dos mediadores inflamatórios. Tal excesso resulta em alteração do ambiente oxidativo vascular, possibilitando uma cascata de eventos, induzindo a disfunção endotelial e, assim, piorando a vasoconstrição. (Figura 1).

Desta forma, tudo propicia a elevação sistêmica da resistência vascular nesta paciente, incluindo a placentária e promovendo hipertensão arterial materna, com redução do aporte sanguíneo fetal.



A gravidez é um processo dinâmico caracterizado por tolerância imunológica, angiogênese e regulação hormonal. A gonadotrofina coriônica (hCG) tem importantes funções na gravidez, promovendo a produção de progesterona, a implantação e a decidualização, a angiogênese, a diferenciação do citotrofoblasto e a regulação celular imunológica (COLE,2010).

Norris e cols (2011), em artigo de revisão, observaram que alterações na regulação do hCG pode contribuir para alterar a tolerância imunológica e a angiogênese, resultando em complicações na gravidez, como a, tão temida, pré-eclâmpsia. Esses autores sugerem ainda que, as alterações podem ocorrer em níveis ou nas funções do hCG e, provavelmente, interferindo na tolerância imunológica e na angiogênese, duas funções vitais para um desfecho de sucesso da gravidez.(NORRIS, 2011)

### 1.2.2 Fatores Angiogênicos/ Antiangiogênicos - Disfunção Endotelial

Em resposta à hipóxia placentária, uma variedade de moléculas são liberadas na corrente circulatória, entre elas fatores inflamatórios, autoimunes e antiangiogênicos (WANG, 2009a; MUTTER, 2008a). O mecanismo de ação dos fatores antiangiogênicos na etiologia e manifestação da pré-eclâmpsia tem sido estudado, principalmente aqueles relacionados ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Esse fator e o fator de crescimento placentário (PIGF) desempenham papel importante na manutenção da função da célula endotelial. A elevação das concentrações circulantes e placentárias da forma solúvel do receptor de VEGF, o Flt-1 (sFlt-1), sinaliza o mecanismo de ação.

O sFlt-1 é receptor circulante para o VEGF e para o PIGF. Assim, quando sua concentração aumenta na circulação determina diminuição da forma livre de VEGF e de PIGF, o que bloqueia o estímulo da angiogênese e manutenção da integridade endotelial. Nos rins, essa inativação da porção livre da VEGF e PIGF é a causa da endoteliose glomerular e, conseqüente, proteinúria (WANG, 2009b; MUTTER, 2008b).

Evidências sugerem que, a pré-eclâmpsia é, primariamente, uma doença endotelial, na qual as células endoteliais perdem sua morfologia achatada e sua função, resultando no enfraquecimento da camada de células endoteliais. Como consequência da disfunção endotelial, as gestantes desenvolvem hipertensão arterial e proteinúria e edema progressivo (ROBERTS, 1989). Essa característica da fisiopatologia da pré-eclâmpsia está ilustrada na Figura 2.

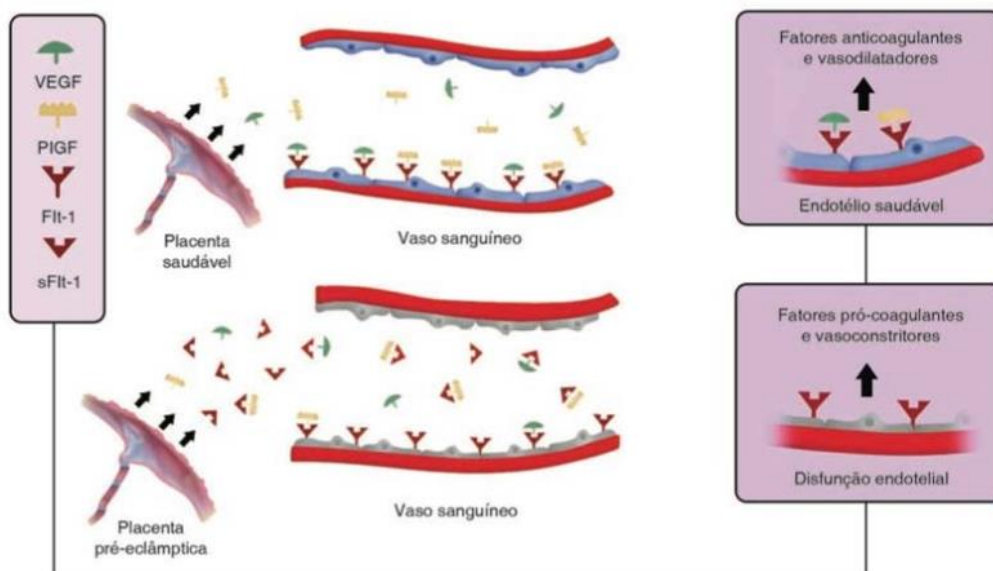


Figura 2: Pré-eclâmpsia e fatores angiogênicos. O Flt-1 solúvel (sFlt-1), fator antiangiogênico secretado pela placenta pré-eclâptica em grande quantidade, causa disfunção endotelial por antagonizar o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento placentário (PlGF). (Adaptado de Kurumanchi *et al*/ Rezende Obstetrícia/Carlos Antonio Barbosa Montenegro, Jorge de Rezende Filho - 12 ed - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2013.

Tentativas de explicar a etiologia da pré-eclâmpsia tem resultado em diversas hipóteses, embora isoladamente não consigam chegar a um denominador comum (MAYNARD, 2003b; ROBERTS, 2009a). As mais importantes envolvem placentação deficiente, predisposição genética, tolerância imune comprometida, resposta inflamatória sistêmica, desbalanço angiogênico e estado nutricional deficiente. (CUNNINGHAM, 2014; NGENE, 2018).

Nesse sentido, REDMAN et al. (2005) propuseram um modelo que caracteriza a fisiopatologia da pré-eclâmpsia em duas fases, pré-clínica e clínica. Na primeira fase (pré-clínica), mudanças no desenvolvimento da placenta e deficiência da circulação uterina resultam em hipóxia placentária e, principalmente, em fenômenos de hipóxia e reoxigenação, que produzem estresse oxidativo e excessiva produção de fatores inflamatórios e anti-angiogênicos. Na segunda fase (clínica), ocorre lesão endotelial sistêmica resultando na hipertensão e no comprometimento de órgãos alvo, sendo a glomeruloesclerose a mais característica e que responde pela proteinúria (JAUNIAUX, 2016).

ROBERTS *et al.*(2009) propuseram uma teoria mais complexa na qual associam essas fases com fatores de constituição materna e fatores de risco para pré-eclâmpsia (ROBERTS, J.M, 2009b). Entre esses destacam-se fatores imunológicos como exposição reduzida a antígenos paternos, fatores de risco como hipertensão arterial e diabetes mellitus prévios, obesidade, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome metabólica, doenças responsáveis por resposta inflamatória crônica basal. Fatores genéticos também estão envolvidos, uma vez que, mulheres de raça negra têm maior risco que as caucasianas. Mais ainda, estudos populacionais revelaram que, filhas e filhos de mulheres que desenvolveram pré-eclâmpsia em suas gestações têm maior risco de desenvolverem pré-eclâmpsia ou terem participação paterna em gestação com pré-eclâmpsia, respectivamente (SKJAERVEN, 2005; ESPLIN, 2001). Recentes estudos clínicos de genomas revelaram associação significativa entre polimorfismo próximo ao locus FLT1 no cromossoma 13. (MCGINNIS, R, .2017; GRAY, K.J, 2018. Também, reconhecidas como fator de risco para pré-eclâmpsia gestações, que se associam a aumento de massa placentária: gemelaridade, mola hidatiforme, hidropsia fetal.

Na Figura 3, observamos a representação esquemática da teoria das duas fases proposta por ROBERTS e col.(2009): predisposição imunológica, genética e fatores de risco maternos, preexistentes podem afetar a invasão citotrofoblástica das artérias espiraladas (placentação anormal) na primeira fase. Na segunda fase, a redução da perfusão útero placentária induz liberação, pela placenta, de fatores antiangiogênicos: forma solúvel do receptor de VEGF e PIGF (sFlt-1) na circulação materna, os quais antagonizam fatores pró angiogênicos, VEGF e PIGF, determinando disfunção endotelial e disfunção vascular sistêmica. Condições maternas pré existentes: hipertensão crônica, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e obesidade estão, também, associadas a disfunção endotelial. A disfunção endotelial inclui diminuição de substâncias vasodilatadoras: Óxido Nítrico (NO) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e incremento de proteínas vasoconstritoras: endothelin-1 (ET-1), determinando disfunção vascular sistêmica.

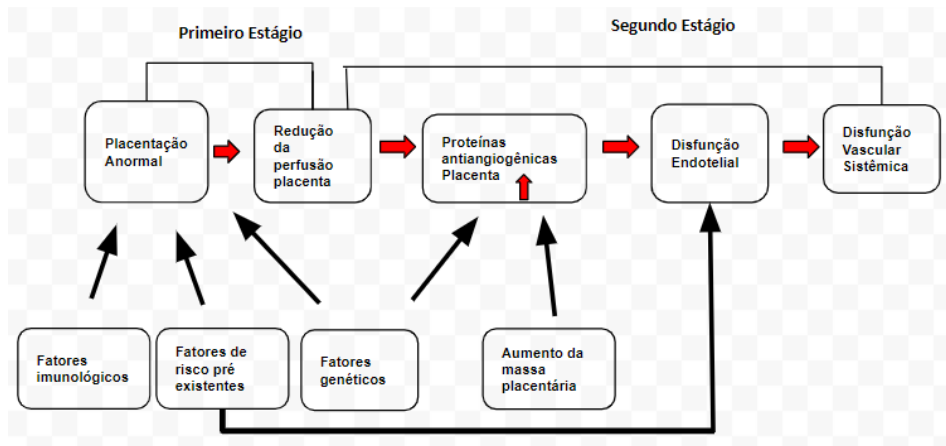


Figura 3: Teoria das duas fases da fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Adaptado de Roberts, J.M. 2009b, apud Tomimatsu 2019a)

### 1.3 Disfunção Vascular Sistêmica

A disfunção vascular sistêmica é considerada o passo final na fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Figura 3). Durante a gestação normal a resistência vascular sistêmica materna diminui, resultando numa leve diminuição da pressão arterial. (MASHINI, I.S, 1987 ; MOUTQUIN, J.M., 1985) Na gestante com pré-eclâmpsia, essas adaptações não ocorrem, de modo suficiente, devido a desordem vascular sistêmica com disfunção endotelial generalizada. Embora, o mecanismo preciso da desordem vascular sistêmica, não esteja esclarecido completamente, anormalidades na matriz de metaloproteinases e incremento na deposição do colágeno na matriz extracelular parecem desempenhar papel significativo na remodelação vascular inadequada determinando a disfunção vascular sistêmica (YU, W., 2019).

Avaliações não invasivas da função vascular tem revelado diretamente a presença de disfunção vascular sistêmica em mulheres com pré-eclâmpsia. (TOMIYAMA, H. 2010). FMD (*Flow-mediated dilation*), dilatação arterial mediada pelo fluxo, é medida não invasiva das disfunção endotelial e por conseguinte da saúde vascular. Melhora da FMD resulta em maior perfusão e suprimento de oxigênio (oxigenação) de tecidos periféricos. FMD tem mostrado um aumento durante a gravidez (DØRUP, 1999). Em mulheres com pré-eclâmpsia, FMD tem sido encontrado em níveis, significantes mais baixos, antes e mesmo após o desenvolvimento da patologia, até 3 anos após o parto (WEISSGERBER, T.L, 2016).

Outras formas não invasivas de avaliação da saúde vascular e disfunção endotelial são as análises da onda pulso e da onda de velocidade de pulso, obtidas por tonometria de pulso, e são úteis na avaliação da rigidez arterial, e estão aumentadas em mulheres com pré-eclâmpsia (OYAMA-KATO, M., 2006; KAIHURA, C, 2009). Além disso, estes testes revelaram a presença de disfunção vascular mesmo após a resolução dos eventos clínicos da pré-eclâmpsia, indicando sua possível associação com risco de futuras doenças cardiovasculares.(TOMIMATSU 2019b)

#### **1.4 Intervenções Farmacológicas para Controle de Gestantes Portadoras de Pré-eclâmpsia**

Tratamento definitivo da pré-eclâmpsia é a resolução da gestação, o que nem sempre é desejável, quando a interrupção da gestação determina o nascimento de uma criança prematura. Por outro lado, a manutenção dessa gravidez eleva o risco de graves complicações, tanto para o feto quanto para a gestante (ROBERTS, 2005).

A terapia com anti-hipertensivos visa impedir a evolução para um estado de crise ou emergência hipertensiva, que coloca em risco o binômio mãe-feto.

O sulfato de magnésio é a droga mais eficaz na prevenção de crise convulsiva, que caracteriza a eclâmpsia, utilizada em situações de iminência de eclâmpsia e como coadjuvante no tratamento da crise ou emergência hipertensiva e na síndrome HELLP (ACOG, 2013b).

## 1.5 Laser

**Laser** é um acrônimo da expressão em inglês de **Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation**, ou seja, luz amplificada por emissão estimulada de radiação (CHAVANTES, 2009), sendo considerado um dos aparelhos mais relevantes desenvolvidos pela engenharia no último século (CHAVANTES, 2009a)

O Laser de baixa intensidade (LBI) ou, simplesmente, Laserterapia ou Terapia de Fotobiomodulação é caracterizado por uma potência inferior a 1 Watt e não deve produzir uma temperatura acima de 1°C no tecido alvo. Portanto, não dependem nem do calor nem da destruição tecidual, sendo considerado como um eficiente modulador do processo biológico no tecido-alvo, revelando um efeito acumulativo de dose. (KARU T., 1999a).

Segundo Tina Karu (1999), a resposta de modulação biomolecular, é um fenômeno fotofísico-químico, que age nos componentes da cadeia respiratória na mitocôndria, dependendo da dose empregada. Estas podem desencadear a estimulação ou a inibição do metabolismo celular, incrementando a biodisponibilidade de energia (ATP) para a célula. O LBI, também, atua nas membranas de sódio e potássio, quanto modula os canais de cálcio intracelulares.(KARU, 1999b)

Vários estudos têm demonstrado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que a ação do LBI, através da biomodulação, é capaz de agir no processo inflamatório, estresse oxidativo, na produção de óxido nítrico, na ação angiogênica, efeitos esses que estão intimamente relacionadas à gênese da pré-eclâmpsia (RICCI, R. apud CHAVANTES, 2009; TOMIMURA, S., 2014)



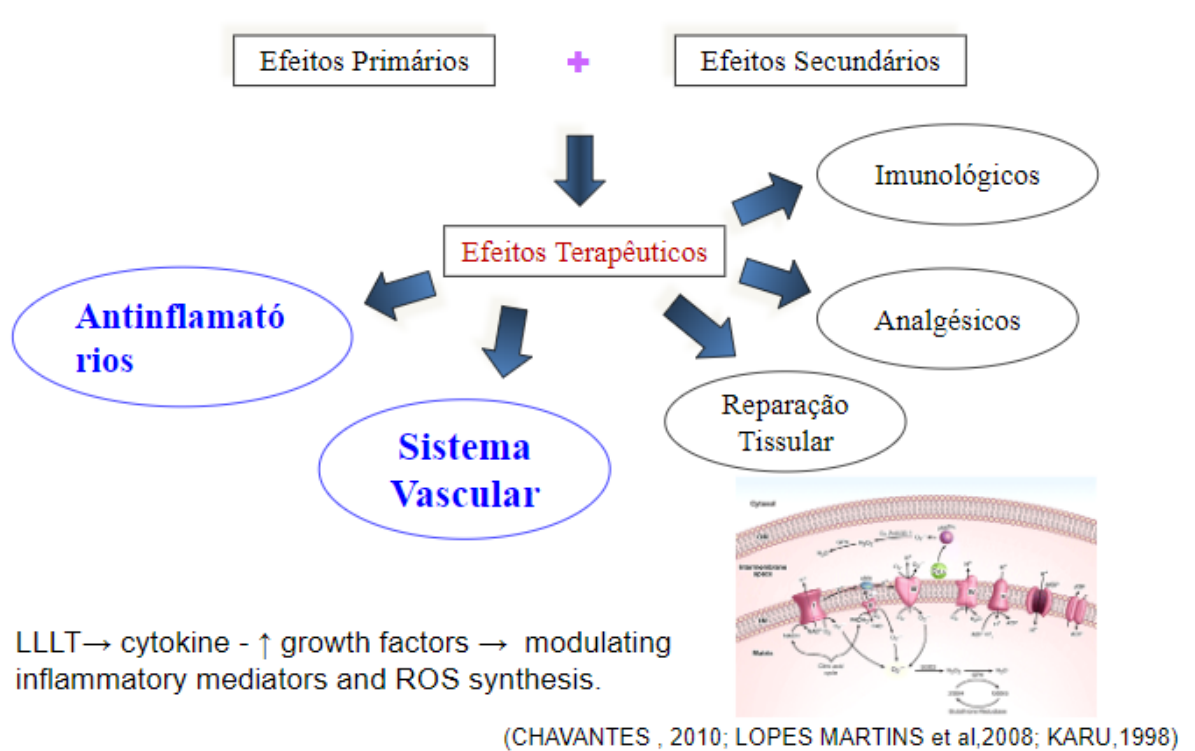


Figura 4: Esquema dos efeitos do Laser de baixa intensidade.

A dosimetria em qualquer modalidade terapêutica é a determinação da dose necessária para se atingir o efeito final desejado. A determinação exata da dose de energia do Laser a ser aplicada no tecido biológico, ainda não pode ser mensurada com exatidão, pois para tal, seria necessária uma tecnologia não disponível no momento (exposição radiante).

As propriedades ópticas do tecido biológico são muito heterogêneas e inúmeras são as variáveis físicas, que influenciam no resultado da terapia, tais como comprimento de onda (nm), densidade de potência ou irradiância, densidade de energia ou fluência, energia por ponto de aplicação, energia total sobre a área tratada, tempo de irradiação (em segundos), área do feixe, tipo de emissão (contínua ou pulsada), tipo e calibração do aparelho, além dos propriedade de cada tecido (CHAVANTES, 2009 p 35-36).

## 1.6 - Efeitos da Laserterapia na Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

Estudos realizados por nossa equipe, coordenados pela profa. Chavantes, tem demonstrado os efeitos positivos do emprego do laser de baixa intensidade, laserterapia, para “tratar” a hipertensão arterial sistêmica.

O trabalho experimental de CANAL et al. (2013) analisou efeitos agudos do Laser de baixa intensidade na pressão arterial sistêmica em ratos Wistar obesos e idosos através do registro da frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM). Os resultados demonstraram que a aplicação do LBI incorreu em uma redução tanto da FC quanto das pressões arteriais sistêmicas, sobretudo da PAM, além de ser um fator indicativo de proteção cardiovascular,

TOMIMURA *et al* (2013) realizaram estudo experimental em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), demonstraram que o LBI diminuiu a PAM, PAD e a FC. Além de modificar os parâmetros oxidativos, alterando concentração de carbonilas plasmáticas e restringiu os danos às proteínas resultantes do estresse oxidativo. Promoveu, ainda, um incremento da produção de Óxido Nítrico (NO), como responsável pela proteção de células endoteliais e com repercussões positivas no endotélio cardiovascular. Dessa forma, o LBI reduziu a inflamação vascular sistêmica através da modulação da resposta autonômica cardiovascular e normalizou os sinais hemodinâmicos em ratos SHR.

De acordo com CHAVANTES et al. (2014) em estudo piloto em humanos, com irradiação do Laser sublingual, aplicação única, obteve-se um impacto efetivo, através da ação da Laserterapia na pressão arterial (PA) de indivíduos hipertensos, contudo sem qualquer modificação da PA em indivíduos normotensos. Os resultados encontrados permitiram concluir que a Laserterapia foi capaz de aumentar a elasticidade arterial, tanto das grandes artérias quanto das arteríolas, bem como melhorar a função endotelial.

Estudo piloto de MADI e colaboradores (2015) participaram deste estudo vinte gestantes divididas em dois grupos (normotensas e hipertensas), a laserterapia alterou de forma eficaz a PA sistêmica com diminuição da resistência vascular periférica, com conseqüente decréscimo da pressão arterial em gestantes com pré-eclâmpsia. A fotobiomodulação evidenciou efeito imediato anti-hipertensivo, na resposta hemodinâmica das gestantes portadoras de hipertensão arterial sistêmica.

Não obstante, é importante mencionar que em gestantes normotensas, o Laser não alterou a pressão arterial sistêmica, nem a resistência vascular periférica.

A Laserterapia não revelou qualquer efeito adverso nos grupos estudados. A terapia com Laser de baixa intensidade não ocasionou qualquer resposta que prejudicasse o feto, considerando-se o bem-estar fetal, avaliado durante o procedimento através do estudo da frequência cardíaca fetal (FCF) por meio da cardiocografia, registro gráfico da FCF, inobstante a Laserterapia sinalizou existir uma repercussão fetal favorável.

Em outro trabalho MADI e colaboradores (2015) estudaram o efeito do Laser de Baixa Intensidade (LBI) aplicado em um modelo animal de hipertensão em ratas SHR prenhas e a influência do laser em sua prole: malformações grosseiras e ósseas e peso dos recém natos. Não foram observados malformações ósseas ou outras malformações grosseiras. Foram evidenciados maior peso ao nascer da prole das ratas tratadas com o Laser. Concluímos que há evidências de uma provável ação do LBI na melhora da perfusão placentária com conseqüente aumento de peso ao nascer, sem mostrar efeitos colaterais ou outros efeitos negativos maternos ou na prole.

MADI e colaboradores (2017) em outro estudo, cujo objetivo foi avaliar o efeito do Laser de Baixa Intensidade aplicado em um modelo animal de hipertensão (SHR) em ratos fêmeas prenhas e a resposta na perfusão sanguínea de órgãos alvos, como útero, rins e coração. Os resultados obtidos mostraram uma variação relativa, quanto elevou a perfusão em porcentagem, entre o basal e pós laser nos diversos órgãos examinados. Observando-se uma grande variação relativa em todos os órgãos estudados, com aumentos que variaram entre 39,68% no útero, 42,55% na média entre os Rins Direito e Esquerdo e 72,49% no coração. Apesar da grande variação relativa observada os valores não foram estatisticamente significante devido ao número pequeno da amostra. Como resultado o laser foi capaz de melhorar a perfusão dos órgãos citados, mesmo com uma única aplicação.

### **1.7 - HUVEC- *Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells***

Após a ressecção pós natal do cordão umbilical, a veia umbilical pode ser canulada e as células endoteliais destacadas por atividade enzimática. Este procedimento foi realizado pela primeira vez por MARUAMA (1963), entretanto foi nos anos 1970's, quando foi aplicado por JAFFE e outros autores, que isolaram com sucesso células que puderam ser cultivadas *in vitro* e identificadas como HUVECs (*Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells*).

As células endoteliais da veia umbilical (HUVECs) cultivadas *in vitro* são comumente usadas em ensaios experimentais. Quando propriamente diferenciadas elas adquirem a conformação de monocamada e podem mimetizar o endotélio *in vivo* que pode ser utilizado para lançar luz nos múltiplos processos relacionados às células endoteliais. JIMENEZ (2013), descreve várias matrizes para isolar e cultivar as HUVECs que resultaram em um modelo experimental que pode ser utilizado em muitos propósitos.

Na pré-eclâmpsia, vilos placentários e células endoteliais do cordão umbilical HUVECs, derivados do feto, muito provavelmente foram submetidas à insuficiência útero-placentárias e hipóxia. Esse ambiente anormal *in vivo* na pré-eclâmpsia pode ser uma razão subjacente pela função alterada nas HUVEC derivadas de gestações pré-eclâmpticas. (YANG GU, 2006)

Assim, nossa hipótese foi estudar a ação da fotobiomodulação (Laser) nas HUVEC de pacientes com PE/HG e gestantes normais, analisando alterações de fatores angiogênicos e antiangiogênicos, produção de NO e citocinas inflamatórias.

Tais propriedades, indutoras de efeito anti-hipertensivo em gestantes com pré-eclâmpsia, pode indicar o desenvolvimento de novas terapêuticas.

**Justificativa:** Diante dos vários trabalhos relacionando uso de Laser de baixa intensidade (LBI), em humanos e modelos animais são necessários mais estudos sobre esse tema. As evidências têm demonstrado diminuição da pressão arterial sistêmica, alterações na resistência vascular sistêmica, fatores angiogênicos, inflamatórios, estresse oxidativo, produção de óxido nítrico, todos esses ligados de alguma maneira às repercussões e a etiopatogenia da hipertensão arterial em indivíduos normais e em gestantes. A busca de mecanismos de ação do Laser em gestantes normotensas e portadoras de PE/HG, justificam esse trabalho.

## **2. Objetivo do Estudo:**

Avaliar o efeito da fotobiomodulação em células do cordão umbilical de gestantes com pré-eclâmpsia por meio da análise dos fatores inflamatórios.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 - Plataforma Brasil

- Universidade Nove de Julho:
  - CAAE: 83127917.4.0000.5511
- Conjunto Hospitalar do Mandaqui:
  - CAAE: 13366319.7.0000.5551
- Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros:
  - CAAE: 13366319.7.3001.0063

#### 3.2 Conceitos (ACOG, 2013)

##### - Caracterização das Formas de Manifestação da Hipertensão Arterial :

• **Hipertensão arterial crônica (HAC):** quando há história de hipertensão arterial, de qualquer etiologia, anterior à gestação ou registro de pressão arterial de pelo menos 140 x 90mmHg antes da 20ª semana de gestação. Também se considera HAC quando a hipertensão é diagnosticada pela primeira vez na segunda metade da gestação e persiste além de 12 semanas após o parto.

• **Pré-eclâmpsia (PE):** manifestação de hipertensão arterial associada à proteinúria ou de hipertensão arterial associada à disfunção de órgão alvo (trombocitopenia, disfunção hepática, insuficiência renal, edema pulmonar, iminência de eclâmpsia ou eclâmpsia), mesmo sem proteinúria, após a 20ª semana de gestação, em gestante previamente normotensa.

• **Hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia (HAC+PE):** definida pelo aparecimento ou piora da proteinúria detectada na primeira metade da gestação e/ou presença de disfunção de órgão alvo após a 20ª semana de gestação.

• **Hipertensão gestacional:** refere-se ao aparecimento de hipertensão arterial sem proteinúria ou manifestação de outros sinais/sintomas de pré-eclâmpsia, em gestante

previamente normotensa, após a 20<sup>a</sup> semana de gestação. A hipertensão deve desaparecer até 12 semana após o parto e, se persistir será renomeada de hipertensão arterial crônica, que foi mascarada pelas alterações fisiológicas da primeira metade da gestação.

### **3.3 Células da Veia do Cordão Umbilical**

As células foram extraídas a partir de cordões umbilicais de gestantes normais (n=5) e gestantes com pré-eclâmpsia/hipertensão gestacional (n=5). Pré-eclâmpsia (PE) é definida, como: hipertensão arterial, PA > 140 x 90 mmHg, associada com proteinúria, > 0,3 g/24h ou sem proteinúria mas com lesão de órgãos alvo e hipertensão gestacional (HG), quando a hipertensão arterial é diagnosticada durante a gestação, sem proteinúria. Em ambas as situações o surgimento deve se dar após a 20<sup>a</sup> semana de gestação.

As gestantes foram selecionadas no pronto socorro (PS) e enfermaria de Patologia da Gestação, bem como no ambulatório de Pré Natal do Serviço de Obstetrícia do Conjunto Hospitalar do Mandaqui, rua Voluntários da Pátria 4301. São Paulo, SP, e no Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros, Av. Celso Garcia 2477, São Paulo, SP, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, SP, quando preencheram os critérios de inclusão e após assinarem o termo de consentimento livre e informado.

### **3.4 Critérios de Inclusão**

Gestantes, com idade de 18 a 49 anos, normotensas (n=5) e com diagnóstico de pré-eclâmpsia e hipertensão gestacional (n=5), com idade gestacional de 20 semanas ou mais, calculada a partir de data da última menstruação (DUM) ou calculada a partir de Ultrassonografia Obstétrica (USG) realizada no primeiro trimestre da gestação, com fetos vivos.

### **3.5 Critérios de Não Inclusão:**

Não foram incluídas gestantes:

- portadoras de outras patologias associadas, como problemas severos cardíacos, respiratórios, neurológicos, renais, colagenoses, diabetes melitus pré existente, doenças infecciosas e neoplasias malignas.
- portadoras de gestação múltipla.
- portadoras de fetos malformados.

### **3.6 Coleta do Cordão Umbilical**

Cordões umbilicais de 20 a 30 centímetros de comprimento foram coletados após partos vaginais ou cesarianas de pacientes normotensas e pacientes com pré-eclâmpsia ou hipertensão gestacional, com precauções para que não houvesse furos nos cordões. Os mesmos foram depositados em frascos estéreis, contendo solução salina a 9%, evitando manipulação excessiva dos cordões e exposição prolongada do frasco aberto, para evitar contaminações.

### **3.7 – Extração de Células do Cordão Umbilical**

Em capela de fluxo laminar, sob condições estéreis, os cordões foram limpos externamente com álcool 70%, sendo realizado a limpeza do cordão internamente com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para a retirada de coágulos (100 mL de PBS). Foi fechado a extremidade inferior e com uma seringa foi injetado, na extremidade superior, cerca de 20 mL de solução de extração composta por tripsina, EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) e PBS. A solução preencheu toda a veia e o cordão foi colocado em recipiente estéril em estufa a 37 °C durante 20 minutos se o cordão tivesse até 12 horas da coleta. Contudo, os cordões com mais de 12 horas da coleta, foram mantidos na estufa durante 30 minutos. Após a incubação, foi aberto a extremidade inferior do cordão e recolhido todo seu conteúdo, massageando externamente o cordão umbilical até o seu total esvaziamento. Lavado com mais 3 pipetas de solução de extração para soltar o restante das células e, posteriormente neutralizado com solução de meio de RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) e SFB (Soro Fetal Bovino). O conteúdo recolhido foi centrifugado a 12 mil rpm por 10 min a 4 °C e foi descartado o sobrenadante. Após ressuspender o sedimento celular, delicadamente, com 1 mL de meio de RPMI, corado com azul de Trypan, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer. A porcentagem de células não



coradas pelo azul de tripan é tomada como medida de viabilidade celular. As células contadas foram separadas em amostras com  $5 \times 10^6$  que foram utilizadas no experimento.

### 3.8 Cálculo da Dosimetria para Terapia de Fotobiomodulação

**Potência:** quantidade de energia produzida ou consumida por unidade de tempo. Mensurada em Watts (W)

$$P = \text{Watts (W)}$$

**Energia:** propriedade de um sistema que lhe permite realizar um trabalho; a unidade de energia é dada em watts multiplicada por segundo, ou seja, mensurada em Joules (J)

$$E = P \times T \text{ (J)}$$

**Potência:** quantidade de energia produzida ou consumida por unidade de tempo. Mensurada em Watts (W)

$$P = \text{Watts (W)}$$

**Densidade de potência (irradiância) = potência/área (W/cm<sup>2</sup>)**

$$DP = \frac{P \text{ (W)} \times T \text{ (s)}}{A \text{ (cm}^2\text{)}} \quad (\text{W / cm}^2)$$

**Densidade de energia (fluência) = potência(W) x tempo (segundos)/área = (J/cm<sup>2</sup>)**

$$DE = \frac{P \text{ (W)} \times T \text{ (s)}}{A \text{ (cm}^2\text{)}} \quad (\text{J / cm}^2)$$

### 3.9 Terapia com Laser de Baixa Intensidade (LBI)

O tratamento com Laser foi realizado com a utilização do Laser de Baixa Intensidade, semiconductor forma contínua (modelo Thera Lase D.M.C., São Carlos, S.P. Brasil). Os parâmetros de irradiação do LBI no protocolo utilizado está demonstrada na tabela abaixo. A área irradiada: 0,04 cm<sup>2</sup>, nas células centrifugadas.

Tabela 1: Parâmetros de irradiação com Laser :

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores do LBI</b>
Comprimento de onda	808 nm
Densidade de energia (DE)	60 J/cm <sup>2</sup>
Energia	12 J
Potência	100 mW
Tempo	120 "
Área Irradiada	0,04 cm <sup>2</sup>
Aplicação	Único Ponto - células

### 3.10 - Análise das Citocinas Inflamatórias

Para verificar a ação do Laser em células do cordão umbilical de gestantes normotensas e hipertensas foi realizada a dosagem das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ , pelo método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou **ensaio de imunoabsorção enzimática**) no sobrenadante colhido destas células.

Os sobrenadantes foram coletados no basal, 15 minutos e 60 minutos após a irradiação com o Laser de baixa potência, em solução com meio de cultura, para a determinação das citocinas. O sobrenadante de cada grupo experimental foi coletado e armazenado em Eppendorf.

O sobrenadante foi coletado para a determinação dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ . Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50  $\mu$ L do anticorpo de captura de anti-IL-6 e TNF- $\alpha$  (Cell Signaling Technology, Inc.U.S. Patent No. 7,429,487), diluídos em PBS, e incubadas por 2 horas, a 37°C. Após esse período, os sítios livres foram bloqueados com 200  $\mu$ L de tampão de bloqueio, contendo gelatina 3% em PBS e as placas foram incubadas por 18 horas, a 4°C. Após lavagem da placa com PBS/Tween 20, 0,05%, 50  $\mu$ L de amostras ou padrões (recombinantes) foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas por 2 horas, a 37°C. A placa foi lavada com de PBS/Tween20, 0,05% e a ligação aos anticorpos foi detectada pela adição do anticorpo de captura, diluído em PBS-gelatina 1% (5 $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ L/poço), seguido de incubação por 1 hora a 37°C. Após lavagem da placa foram adicionados 50  $\mu$ L de avidina-fosfatase alcalina, na diluição de 1:15000 em PBS-gelatina 1%, e incubados por mais 30 min à temperatura ambiente, lavando-se em seguida. Para a revelação, foi utilizado o substrato cromógeno P-nitrofenil fosfato (200  $\mu$ L/mL), diluído em 1:5 em TRIS-HCl pH 9,8 1 M e 14 salina 0,5 M. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (*Spectramax Molecular Devices, Sunnyvale, CA, US*) a 450 nm e os resultados confrontados a uma curva padrão efetuada com o anticorpo recombinante para a determinação da concentração de cada citocina, representada em ng/mL

### **3.11 - Análise Estatística:**

Inicialmente, os dados foram analisados descritivamente por meio de medidas-resumo (média e desvio padrão).

A comparação de médias entre dois grupos foi realizada utilizando-se o método não paramétrico de Mann-Whitney devido à limitação da amostra. Já a comparação de médias entre momentos de avaliação foi realizada empregando-se o teste de Wilcoxon.

Para todos os testes estatísticos foram adotados um nível de significância de 5%.

As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o software estatístico SPSS 20.0 e STATA 12 (Gráficos).

## 4 - Resultados

### 4.1 - Identificação das Células do Cordão Umbilical

Para análise por citometria de fluxo, as células, sem nenhum tratamento prévio, foram incubadas com o anticorpo PE mouse anti-human CD-31, durante 20 min. teste foi realizado em duplicata e repetido 6 vezes. A citometria de fluxo apontou nas amostras cerca de 4% de células endoteliais extraídas da veia do cordão umbilical

### 4.2 - Comparação entre os Grupos

Tabela 2. Tabela descritiva dos grupos

	Normotensas		PE/HG		p
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Idade (anos)	28,9	6,8	33,2	6,6	0,69
IG (semanas)	39,6	1,7	37,8	1,3	0,095
Gestações (n)	2,6	1,1	3,4	2,1	0,841
Início do Pré Natal (sem)	10,2	5,5	11,2	2,5	0,19
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,4	7,6	33,2	4,9	0,286
PAS na admissão (mmHg)	115	8	148	27	0,008
PAD na admissão (mmHg)	89	7	93	15	0,095
IG no parto (semanas)	39,6	1,7	37,8	1,3	0,841
<p>p - nível descritivo do teste de Mann-Whitney.  IMC Índice de Massa Corpórea  PAS: pressão arterial sistólica PAD: pressão arterial diastólica IG idade gestacional</p>					

p - nível descritivo do teste de Mann-Whitney. Legenda: IG: idade gestacional; IMC: Índice de Massa Corpórea; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; PAM: Pressão Arterial Média; FC: Frequência Cardíacas; RN: Recém Nascido.

Conforme Tabela 2, não se observaram diferenças nas médias de todas as características, exceto pressão sistólica (p=0,008). Conforme esperado, as gestantes

com PE/HG apresentaram média superior da PAS (Pressão Arterial Sistêmica) ao das mulheres normotensas.

### 4.3 - Mediadores Inflamatórios : TNF- $\alpha$ e IL6

Conforme Tabela 3 e Figura 6, não se verificaram diferenças de médias de TNF- $\alpha$  por condição das gestantes (normotensa ou PE/HG) antes da aplicação de laser e 15 minutos após. Não houve diferença das médias de TNF- $\alpha$  60 minutos após aplicação do Laser entre os gestantes normotensas e hipertensas entre si, mas se verificou um aumento desta citocina, após 60 minutos, entre as gestantes de cada grupo. O Laser modificou estas concentrações. ( $p > 0,05$  não é significativo).

Tabela 3 – Medidas-resumo de TNF- $\alpha$  antes e após a aplicação do Laser: 15 minutos e 60 minutos, segundo condição das gestantes.

	Normotensas				HA/PE			
	Controle	Laser	Diferença	p	Controle	Laser	Diferença	p
TNF - 15'	21,2 $\pm$ 1,04	21,2 $\pm$ 1,04	0,00 $\pm$ 0,00	1,000	21,4 $\pm$ 0,65	21,4 $\pm$ 0,65	0,00 $\pm$ 0,00	1,000
TNF - 60'	93,66 $\pm$ 6,1	110,15 $\pm$ 5,64	<b>16,49 <math>\pm</math> 4,89*</b>	0,043	97,53 $\pm$ 1,62	106,54 $\pm$ 3,11	<b>9,01 <math>\pm</math> 3,24*</b>	0,043

p - nível descritivo do teste de Wilcoxon (comparação entre controle e laser).  
 Comparação de médias 60'- normotensas x HA/PE: TNF ( $p=0,047$ ).

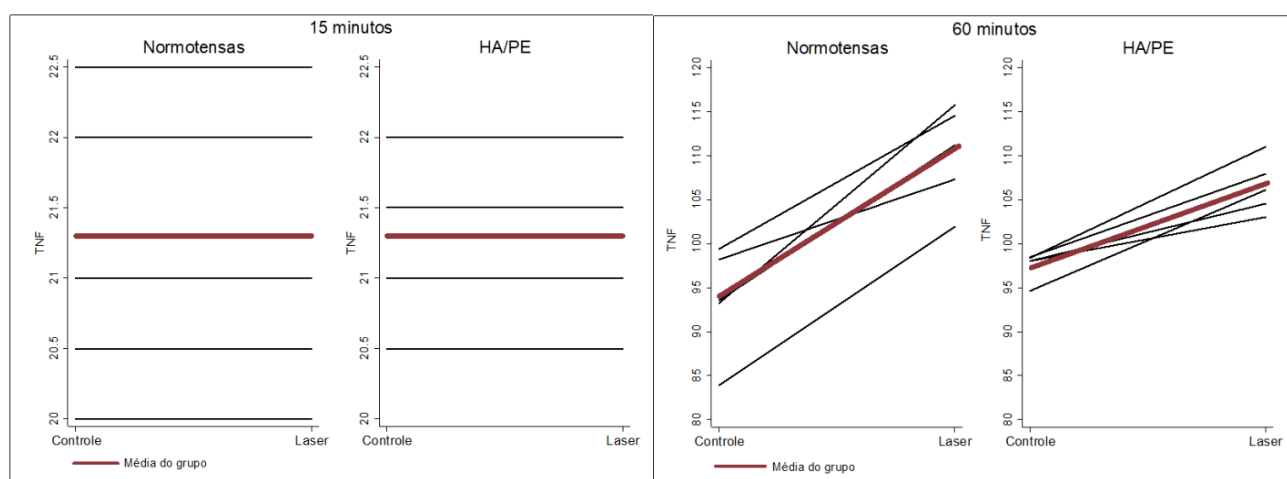
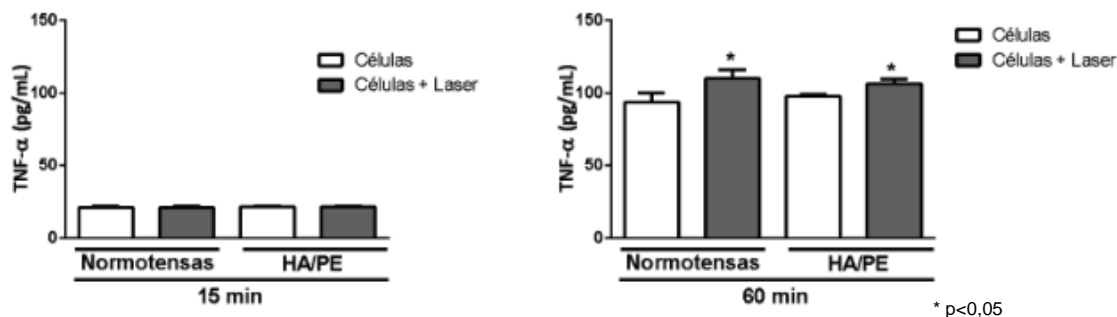


Figura 6 – TNF- $\alpha$  antes e após a aplicação do Laser por 15' e 60' individual e média do grupo por condição da gestante



**Figura 7 - TNF- $\alpha$  antes e após a aplicação do Laser por 15' e 60' individual e média do grupo por condição da gestante**

A Tabela 4 e as Figuras 8 e 9, revelam os resultados obtidos na análise da citocina IL 6 no sobrenadante das células antes, após 15 minutos e após 60 minutos da aplicação do laser nas células. Observamos que entre as gestantes normotensas, não houve diferença entre as médias, após 15 min, e após 60 minutos houve uma diminuição dos níveis de IL6, estatisticamente significantes. O mesmo se observa quando avaliamos o comportamento desta citocina entre as gestantes hipertensas. O que chama a atenção em relação a análise da IL6 foi que os níveis médios entre os grupos, nas gestantes hipertensas, apesar de demonstrarem um comportamento geral semelhante, foram bem menores comparados com as gestantes normotensas.

**Tabela 4 – Medidas-resumo de IL6 antes e após a aplicação do Laser: 15 minutos e 60 minutos, segundo condição das gestantes.**

	Normotensas				HA/PE			
	Controle	Laser	Diferença	p	Controle	Laser	Diferença	p
IL6 - 15'	0,96 $\pm$ 0,42	0,98 $\pm$ 0,43	0,02 $\pm$ 0,05	0,686	0,40 $\pm$ 0,41	0,37 $\pm$ 0,44	-0,02 $\pm$ 0,05	0,465
IL6 - 60'	1,15 $\pm$ 0,45	1,00 $\pm$ 0,42	<b>-0,14 <math>\pm</math> 0,07</b>	0,043	0,55 $\pm$ 0,46	0,44 $\pm$ 0,45	<b>-0,11 <math>\pm</math> 0,03</b>	0,043

p - nível descritivo do teste de Wilcoxon (comparação entre controle e laser).

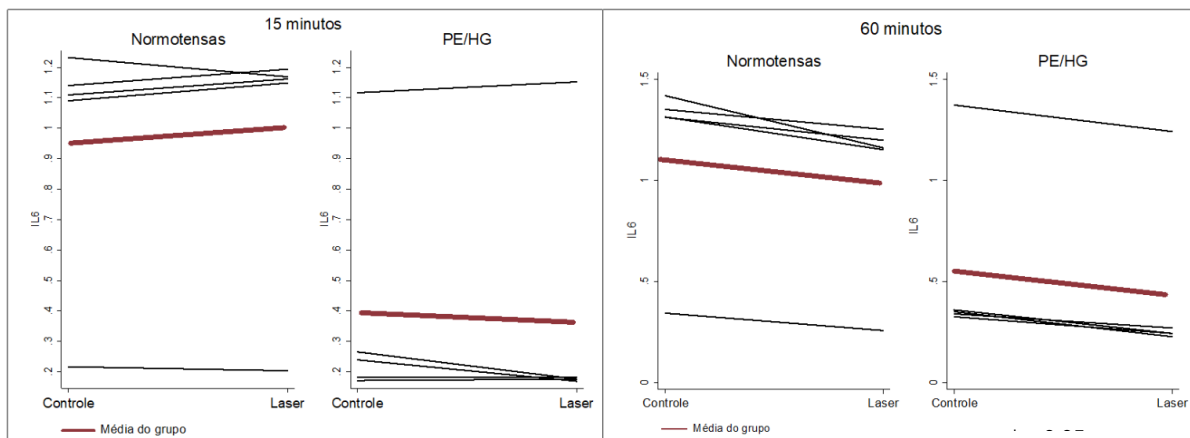
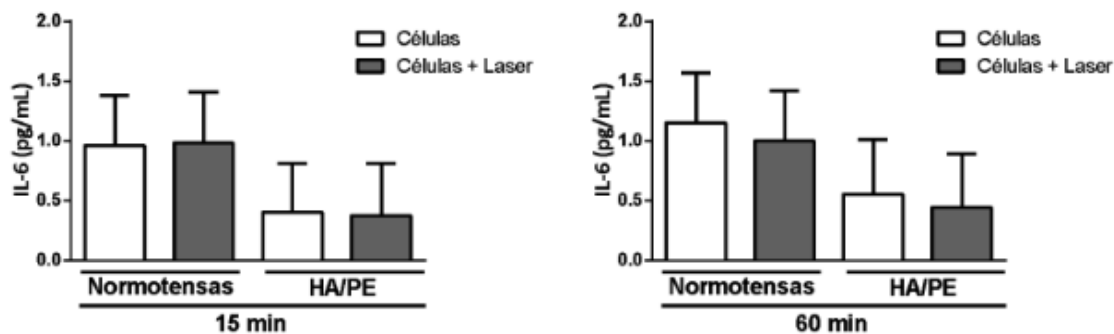


Figura 8 – IL6 antes e após a aplicação do Laser por 15' e 60' individual e média do grupo por condição da gestante.



\* $p < 0,05$

Figura 9 – IL6 antes e após a aplicação do Laser por 15' e 60' individual e média do grupo por condição da gestante.



## 5. Discussão

Em nosso estudo piloto foram selecionadas gestantes com hipertensão gestacional (HG) ou pré-eclâmpsia e gestantes saudáveis, em número de cinco em cada grupo. A análise das características das parturientes, observamos que são grupos semelhantes em vários aspectos, contudo revelando diferenças significantes quanto a pressão arterial sistólica (PAS), o que era de se esperar, apesar não ter havido diferença em relação a pressão arterial diastólica (PAD), provavelmente, por ter sido a aferição no momento da admissão à maternidade, o que pode gerar, normalmente, algum grau de ansiedade.

Ainda comparando os grupos, as gestantes normotensas tiveram como desfecho partos vaginais após trabalho de parto, enquanto as gestantes com pré-eclâmpsia e hipertensão gestacional foram submetidas a parto cesárea, sem o estresse do trabalho de parto. Um importante viés que pode ter influenciado tanto na concentração de TNF- $\alpha$  e IL6 bem como na resposta ao laser. Outra diferença foi observado no grupo de gestantes hipertensas, que eram em número de 4 com pré-eclâmpsia e uma com hipertensão gestacional, o que pode ter influenciado em nossos resultados.

A resposta quanto a diminuição do IL 6 em ambos os grupos pode ser esperada, devido ao estresse inflamatório em ambos os grupos e a ação do laser como anti inflamatório.

Outro item, que atrai a atenção é o IMC (Índice de Massa Corpórea) que demonstra ser maior no grupo de gestantes hipertensas, apesar de estatisticamente não ser significativo, possivelmente devido ao número pequeno da amostra. Vários estudos demonstraram o IMC, como importante fator de risco para a HG. J G Ray (2016) em revisão sistemática e metanálise de fatores de risco clínico para pré-eclâmpsia, estudaram trabalhos com mais de 1000 participantes com o objetivo de avaliar aspectos clínicos em gestantes com 16 semanas de gestação ou menos. Entre os fatores de risco analisados o  $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ , resultou em risco relativo de 2,8 (2,6 a 3,1) com intervalo de confiança de 95%, segundo BARTSCH (2016). Em outro estudo, de revisão sistemática para avaliar fatores de risco para pré-eclâmpsia,

DUCKITT et al (2005), determinaram o risco relativo do  $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$  na primeira visita do pré natal de 2,12 (1,56-2,88), com intervalo de confiança de 95%.

A determinação destes fatores de risco para pré-eclâmpsia no início das gestações e, portanto, do cuidado pré natal, são importantes para uso de iniciativas e protocolos de prevenção, as recomendações de medidas preventivas da ISSHP (*International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*) e ACOG (*American College of Obstetricians and Gynecologists*) são uso de aspirina em baixa dose e de complementação de Cálcio em gestantes com dieta de baixa ingesta.

— Estudos demonstram aumento nas concentrações da forma solúvel do receptor de VEGF, sFlt-1, na circulação de pacientes com pré-eclâmpsia (MAYNARD SE, 2003a; AHMAD S, 2004). A sFlt-1 é produzida na placenta e secretada na corrente sanguínea, onde se liga e neutraliza a VEGF e a PlGF, com grande afinidade, impedindo, assim, a ligação inata desses fatores angiogênicos na célula endotelial. Assim, os níveis circulatórios de VEGF estão diminuídos nas gestantes com HG/PE (CLARK DE ET AL., 1998).

Em nosso estudo não foi possível determinar a VEGF por ensaio de Western Blot nas células endoteliais do cordão umbilical, devidos a vários motivos possíveis e não houve oportunidade de repetição deste ensaio.

PERAÇOLI e colaboradores (2011) avaliaram a associação entre hiperuricemia e incremento na produção de espécies reativas de oxigênio e fator de necrose tumoral, bem como o nível de TNF- $\alpha$  produzidos por monócitos, especialmente, em gestantes com pré-eclâmpsia comparadas com gestantes normais. Relataram que, os níveis séricos elevados de ácido úrico estão correlacionados com níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e maior produção de TNF- $\alpha$  pelos monócitos, em mulheres com pré-eclâmpsia.

Em 2018, a Associação Europeia para o tratamento da Hipertensão (ESH - *European Society of Hypertension*) e a Sociedade Europeia de Cardiologia (ESC), atualizou as recomendações e acrescentaram a hiperuricemia entre os fatores de risco de hipertensão arterial sistêmica. Também, foi relatada a disfunção endotelial em pacientes com hipertensão e hiperuricemia, como comorbidade relevante.

Vários estudos têm descritos uma forte associação entre níveis alterados de IL 6 e pré-eclâmpsia. A maioria dos estudos reportam elevação dos níveis séricos de IL 6 no terceiro trimestre da gestação de gestantes com pré-eclâmpsia (GREER, I.A., 1994; KUPFERMINEK, M.J., 1996). Da mesma forma, outros estudos reportam não

terem encontrado alteração dos níveis séricos de IL 6, quando comparado com gestantes normais (AL-OTHMAN, S., 2001; BOREKCI, B., 2007). A elevação dos níveis plasmáticos de IL 6, quando evidente, aparece mais no final da gestação, segundo FREEMAN, D.J. (2004) e é, potencialmente, devido a elevação da síntese desta citocina pelos monócitos circulantes (LUPPI, P., 2006.). Células decíduais de pacientes com PE exibem alta produção de IL 6 (LOCKWOOD, C.J., 2008).

De modo interessante, um outro estudo demonstra incremento na expressão de IL6 mRNA junto com redução na frequência de macrófagos regulatórios em tecidos decíduais de mulheres, que tardiamente progrediram para desenvolver hipertensão induzida pela gestação, sugerindo que este distúrbio se origina no primeiro trimestre da gestação ainda antes que surjam os principais sintomas (PRINS, J.R. 2012).

Uma função da IL6 na progressão da PE pode depender do nível de ativação vascular. A produção do IL6 na células endoteliais é elevada após células endoteliais fagocitarem debris necróticos trofoblásticos e está implicada na difusão da resposta da ativação vascular (CHEN, Q., 2009). Os níveis elevados circulatórios de IL 6 na mulher com pré-eclâmpsia pode vir a exacerbar e amplificar esta resposta de ativação vascular, por ação nos trofoblastos, para promover excessiva derrama de debris necróticos no sentido de sustentar essa doença (CHEN, L.M., 2010).

MTALI e colaboradores (2019), em estudo envolvendo grupos de gestantes hipertensas e normais e comparando perfil hematológico, coagulação e citocinas entre os grupos, demonstraram em seus resultados que os níveis de hemoglobina estão levemente, porém, significativamente, diminuídos nas hipertensas, o mesmo foi encontrado para as plaquetas. A contagem de neutrófilos e os níveis de IL 6 foram, significativamente, elevados nas hipertensas, sendo que esse incremento foi maior e estando relacionado à gravidade da doença. A contagem dos eosinófilos é normal nas gestantes normais e está reduzida mais intensamente, conforme a severidade da doença, a ponto de estar próximo a ausente nas mulheres com Eclâmpsia, com taxas relevantes de mortalidade e morbidade materna e perinatal. (MTALI, Y.S., 2019).

Em nosso estudo, os níveis de IL 6 no sobrenadante das células foi maior entre as gestantes normotensas em relação às gestantes hipertensas. As alterações não foram estatisticamente significantes, provavelmente, devido ao número pequeno de nossa amostra, todavia foram muito evidentes demonstrando que os níveis encontrados nas hipertensas foi menos da metade daqueles encontrados nas gestantes normais.

WANG e colaboradores (2018) estudaram gestantes normais e compararam com gestantes com hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia leve e pré-eclâmpsia grave, conforme definição e critérios do ACOG de 2013, em relação aos níveis de perfil lipídico e citocinas. Os resultados demonstraram que, entre as citocinas estudadas, IL 6 e TNF- $\alpha$  evidenciaram níveis elevados nas gestantes hipertensas em relação às gestantes normais, e estando correlacionados com a severidade da doença.

GÓRALCZYK e colaboradores (2016) estudaram o efeito da LLLT empregando os 635 nm e 830 nm na secreção de fatores inflamatórios IL6 e TNF- $\alpha$  em células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVEC) em cultura e sob condições de hiperglicemia. O resultados denotaram níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL 6 nos grupos de células tratadas com hiperglicemia, entretanto estas diminuíram com aplicação do laser na faixa de 830 nm.

KOVALENKO e colaboradores (2020) estudaram a influência da fotobiomodulação em pacientes hipertensos e hiperuricemia, como comorbidade, avaliando, assim, a velocidade de onda de pulso, o índice de performance miocárdica, a vasodilatação dependente do endotélio e resultando no efeito da fotobiomodulação nestes pacientes. Foi utilizada junto a droga anti-hipertensiva, a laserterapia intravenosa, comprimento de onda de 635 nm, num curso de 10 procedimentos. Os autores concluíram que a associação de fotobiomodulação e droga anti hipertensiva é recomendada por melhorar tanto os níveis de ácido úrico, como os níveis de pressão arterial.

Nosso estudo demonstrou que a FBMT foi capaz de provocar uma redução dos níveis de IL 6, nas gestantes normotensas e hipertensas.

## **6. Considerações Finais**

Quando atentamos para o objetivo principal deste trabalho de avaliar o efeito da fotobiomodulação em células endoteliais do cordão umbilical de gestantes com pré-eclâmpsia e normais, por meio da análise dos fatores angiogênicos e inflamatórios, no sentido de procurar estabelecer mecanismos de ação: foi observado, que ocorreu uma redução dos níveis de IL 6 no sobrenadante das células, 60 minutos após serem tratadas com Laser; sendo que, também, foi encontrado os mesmos resultados obtidos por diversos trabalhos documentados na literatura científica.

Ao avaliar os resultados, na mesma linha de pesquisa do uso do laser de baixa intensidade ou, seja, da fotobiomodulação em indivíduos hipertensos e, particularmente, em gestantes humanos, e, também, em modelos animais de hipertensão arterial, constatamos que a FBMT pode ser uma arma eficaz no combate a esta patologia, que atinge tanto mulheres, quanto sua herança com taxas relevantes de mortalidade e morbidade materna e perinatal.

Mais estudos se fazem necessários com uma amostra maior de pacientes a fim de responder definitivamente a esse objetivo.

## 7. REFERÊNCIAS

ACGO - American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013;122(05): 1122–1131. Doi: 10.1097/01.AOG.0000437382.03963.887)

AHMAD S, AHMED A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res* 2004;95:884 –91

ALLIS AB, SAFTLAS AF, HSIA J, ATRASH HK. Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987-2004. *Am J Hypertens*. 2008;21(5):521-526. doi:10.1038/ajh.2008.20

AL-OTHMAN, S., OMU, A.E., DIEJOMAOH, F.M., AL-YATAMA, M., AL-QATTAN, F., . Differential levels of interleukin 6 in maternal and cord sera and placenta in women with pre-eclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2001 52, 60–65.)

AMARAL LA, WALLACE K, OWENS M, LAMARCA B. Pathophysiology and current clinical management of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep*. 2017;19:61

ANANTH CV, VINTZILEOS AM. Medically indicated preterm birth: recognizing the importance of the problem. *Clin Perinatol* 2008; 35(01):53–67, viii. Doi: 10.1016/j.clp.2007.11.001)

BARTSCH,E, MEDCALF, KE, PARK A.L., RAY,J.G. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies, *BMJ* 353 (2016) i1753.

BOLETIM MINISTÉRIO DA SAÚDE de 28 de Maio de 2020 acessível por: <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46970-brasil-reduziu-8-4-a-razao-de-mortalidade-materna-e-investe-em-aco-es-com-foco-na-saude-da-mulher>)

BOREKCI, B., AKSOY, H., AL, R.A., DEMIRCAN, B., KADANALI, S., . Maternal serum interleukin-10, interleukin-2 and interleukin-6 in pre-eclampsia and eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007 58, 56–64)

BROWN, M. Pregnancy Hypertension (2018), <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.05.004>).

CALLAGHAN WM, MACKAY AP, BERG CJ. Identification of severe maternal morbidity during delivery hospitalizations, United States, 1991-2003. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199(2):133.e1-133.e1338. doi:10.1016/j.ajog.2007.12.020)

CANAL M, CONTI FF, SANCHES IC, PINTO N, ASSUMPÇÃO B, PINTO M, DUARTE I, DE ANGELIS K, CONSOLIM-COLOMBO F, CHAVANTES MC. Hemodynamic Changes in Elderly Obese Rats After Low Level Laser Therapy: An Experimental Study. ASLMS - 33th American Society for Laser in Medicine and Surgery. Congress Annais. Boston, MA, USA. 2013).

C.S. HOMER, M.A. BROWN, G. MANGOS, G.K. DAVIS, Non-proteinuric pre-eclampsia: a novel risk indicator in women with gestational hypertension, *J. Hypertens.* 26 (2) (2008) 295–302.)

CLARK DE, SMITH SK, HE Y, DAY KA, LICENCE DR, CORPS AN, et al. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998;59:1540 –8)

CHAVANTES, Maria Cristina. *Laser em Bio-Medicina - Princípios e Práticas.* p. 15 Editora Atheneu, 2009, São Paulo, Brasil).

CHAVANTES MC, MORAIS TL, PINTO NC, TOMIMURA S, SILVA-ASSUNÇÃO BP, CANAL M, PINTO NC, NAKATA LS, CALLADO IS, LOPES H, CONSOLIM-COLOMBO F. Study's Significance from Arterial Elasticity and Variation in Arterial Blood Pressure for Normotensive and Hypertensive Patients applying Pre and Post

Laser Therapy: Preliminary Results. BIOS -Proceedings (8926-77),46. SPIE, 2014. USA

CHEN, Q., STONE, P., CHING, L.M., CHAMLEY, L. A role for interleukin-6 in spreading endothelial cell activation after phagocytosis of necrotic trophoblastic material: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *J. Pathol.*2009. 217, 122–130.)

CHEN, L.M., LIU, B., ZHAO, H.B., STONE, P., CHEN, Q., CHAMLEY, L., 2010. IL-6 TNFalpha and TGFbeta promote non apoptotic trophoblast deportation and subsequently causes endothelial cell activation. *Placenta* 31, 75–80.)

COLE LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:102. Published 2010 Aug 24. doi:10.1186/1477-7827-8-102)

CUNNINGHAM GF, LEVENO KJ, BLOOM SL, ET AL. in *Williams Obstetrics*. 24th ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2014 18

DADELSZEN P, MAGEE LA, ROBERTS JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2003;22(02):143–148. Doi:10.1081/PRG-120021060)

DUCKITT K, HARRINGTON D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005; 330(7491):565. Doi: 10.1136/bmj.38380.674340.

DULEY L. Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy. *British Medical Bulletin* 2003; 67: 161–176.

DØRUP, I.; SKAJAA, K.; SØRENSEN, K.E. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *Am. J. Physiol.* 1999, 276, H821–H825



ESPLIN, M.S.; FAUSETT, M.B.; FRASER, A.; KERBER, R.; MINEAU, G.; CARRILLO, J.; VARNER, M.W. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 2001, 344, 867–872. [CrossRef] [PubMed]

FREEMAN, D.J., MCMANUS, F., BROWN, E.A., CHERRY, L., NORRIE, J., RAMSAY, J.E., CLARK, P., WALKER, I.D., SATTAR, N., GREER, I.A., . Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension* 2004 44, 708–714

G.K. DAVIS, C. MACKENZIE, M.A. BROWN, C.S. HOMER, J. HOLT, L. MCHUGH, G. MANGOS, Predicting transformation from gestational hypertension to preeclampsia in clinical practice: a possible role for 24 hour ambulatory blood pressure monitoring, *Hypertens. Pregnancy* 26 (1) (2007) 77–87.)

GIMBRONE, MA JR, COTRAN RS, FOLKMAN J Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* (1974) 60:673–684)

GÓRALCZYK K, SZYMAŃSKA J, SZOT K, FISZ J, ROŚĆ D. Low-level laser irradiation effect on endothelial cells under conditions of hyperglycemia. *Lasers Med Sci.* 2016;31(5):825-831. doi:10.1007/s10103-016-1880-4)

GRAY, K.J.; SAXENA, R.; KARUMANCHI, S.A. Genetic predisposition to preeclampsia is conferred by fetal DNA variants near FLT1, a gene involved in the regulation of angiogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2018, 218, 211–218

GREER, I.A., LYALL, F., PERERA, T., BOSWELL, F., MACARA, L.M.. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet. Gynecol.* 1994 84, 937–940

HUPPERTZ B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008;51(04):970–975. Doi: 10.1161/HYPERTENSION.AHA.107.107607

JAUNIAUX E, BURTON GJ. The role of oxidative stress in placental related diseases of pregnancy. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2016;45(08):775–785. Doi: 10.1016/j.jgyn.2016.02.012

JIMENEZ, N, POST, JA, KROUWER, VD. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology* (2013) 65:1–14)

KAIHURA, C.; SAVVIDOU, M.D.; ANDERSON, J.M.; MCENIERY, C.M.; NICOLAIDES, K.H. Maternal arterial stiffness in pregnancies affected by preeclampsia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009, 297, H759–H764).

KARU T. PRIMARY and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999;49(1):1-17.)

KOVALENKO, SIM, MELEKHOVETS, OK, MELEKHOVETS, YU. Estimation of the influence of photobiomodulation on the endothelial function in patients with arterial hypertension under the conditions of hyperuricemia. *Fotobiologia e fotomedicina* , n. 28, p. 9-15 de janeiro, 13. 2020 DOI 10.26565/2076-0612-2019-28-01)

KUKLINA EV, AYALA C, CALLAGHAN WM. Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States. *Obstet Gynecol.* 2009;113(6):1299-1306. doi:10.1097/AOG.0b013e3181a45b25)

KUPFERMINEC, M.J., PEACEMAN, A.M., ADERKA, D., WALLACH, D., SOCOL, M.L., Soluble tumor necrosis factor receptors and interleukin-6 levels in patients with severe preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 1996. 88, 420–427).

LOCKWOOD, C.J., YEN, C.F., BASAR, M., KAYISLI, U.A., MARTEL, M., BUHIMSCHI, I., BUHIMSCHI, C., HUANG, S.J., KRICKUN, G., SCHATZ, F., Preeclampsia Related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am. J. Pathol.* 2008 172, 1571–1579.)

LUPPI, P., DELOIA, J.A. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin. Immunol.* 2006.118, 268–275

MADI, O. Análise da resposta hemodinâmica imediata da aplicação do laser de baixa intensidade em gestantes hipertensas e normotensas / Otavio Madi, 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, 2015)

MADI, O, ORTEGA AMR, SOUZA LIMA BDM, BONINI SC, MERIGUE G, ISHIKAWA LL, VALDESOIRO AVL, CHAVANTES, MC. Laserterapia poderia melhorar o resultado perinatal em fetos de ratos fêmeas hipertensos? X COMA Universidade Nove de Julho, 2015)

MADI, O., CHAVANTES, MC; CONSOLIN COLOMBO, F; DE ANGELIS,K; TAKAKI,CA; ANDRADE,RP; GOBI, CE; OLIVEIRA, Análise de uma única aplicação de laser de baixa intensidade na perfusão sanguínea do útero e outros órgãos de ratas SHR prenhas. PBC. XII COMA Universidade Nove de Julho, 2017

MARUYAMA Y (1963) The human endothelial cell in tissue culture. Z Zellforsch Mikrosk Anat 60:69–79)

MASHINI, I.S.; ALBAZZAZ, S.J.; FADEL, H.E.; ABDULLA, A.M.; HADI, H.A.; HARP, R.; DEVOE, L.D. Serial noninvasive evaluation of cardiovascular hemodynamics during pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 1987, 156, 1208–1213

MAYNARD SE, MIN JY, MERCHAN J, LIM KH, LI J, MONDAL S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J Clin Invest 2003;111:649–58.

MCGINNIS, R.; STEINTHORSDDOTTIR, V.; WILLIAMS, N.O.; THORLEIFSSON, G.; SHOOTER, S.; HJARTARDOTTIR, S.; BUMPSTEAD, S.; STEFANSDOTTIR, L.; HILDYARD, L.; SIGURDSSON, J.K.; et al. Variants in the fetal genome near FLT1 are associated with risk of preeclampsia. Nat. Genet. 2017, 49, 1255–1260. [CrossRef] [PubMed]

MORSE ML, FONSECA SC, BARBOSA MD, CALIL MB, EYER FPC. Mortalidade materna no Brasil: o que mostra a produção científica nos últimos 30 anos? *Cad. Saúde Pública*. 2011; 27(4):623-638.

MOUTQUIN, J.M.; RAINVILLE, C.; GIROUX, L.; RAYNAULD, P.; AMYOT, G.; BILODEAU, R.; PELLAND, N. A prospective study of blood pressure in pregnancy: Prediction of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1985, 151, 191–196.)

MTALI, Y.S., LYIMO, M.A., LUZZATTO, L. *et al.* Hypertensive disorders of pregnancy are associated with an inflammatory state: evidence from hematological findings and cytokine levels. *BMC Pregnancy Childbirth* 19, 237 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12884-019-2383-7>).

MURPHY DJ, STIRRAT GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2000;19(02): 221–231. Doi: 10.1081/PRG-100100138)

MUTTER WP, KARUMANCHI SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res.* 2008;75(1):1-8. doi:10.1016/j.mvr.2007.04.009).

NESS RB, SIBAI BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195(01):40–49. Doi: 10.1016/j.ajog.2005.07.049)

NGENE NC, MOODLEY J. Role of angiogenic factors in the pathogenesis and management of pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2018;141(01):5–13. Doi: 10.1002/ijgo.12424).

NORRIS W, NEVERS T, SHARMA S, KALKUNTE S. Review: hCG, preeclampsia and regulatory T cells. *Placenta*. 2011;32 Suppl 2(Suppl 2):S182-S185. doi:10.1016/j.placenta.2011.01.009

OYAMA-KATO, M.; OHMACHI, M.; TAKAHASHI, K.; SUZUKI, S.; HENMI, N.; YOKOYAMA, Y.; KURACHI, H. Change in pulse wave velocity throughout normal pregnancy and its value in predicting pregnancy-induced hypertension: A longitudinal study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2006, 195, 464–469. [CrossRef]

P. SAUDAN, M.A. BROWN, M.L. BUDDLE, M. JONES, Does gestational hypertension become pre-eclampsia? *Br. J. Obstetr. Gynaecol.* 105 (11) (1998) 1177–1184.).

PERAÇOLI, et al Pre-eclampsia/Eclampsia, *Rev Bras Ginecol Obstet* 2019;41:318–332. 2019

PERAÇOLI MTS, BANNWART CF, CRISTOFALO R, MEDEIROS BORGES VT, ARAÚJO COSTA RA, WITKIN SS, PERAÇOLI JC. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol* 2011; 66: 460–467 doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01016.x

PRINS, J.R., FAAS, M.M., MELGERT, B.N., HUITEMA, S., TIMMER, A., HYLKEMA, M.N., ERWICH, J.J., . Altered expression of immune-associated genes in first-trimester human decidua of pregnancies later complicated with hypertension or foetal growth restriction. *Placenta* 2012 33, 453–455.

SIBAI BM, DEKKER G, KUPFERMINEC M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005;365(9461):785-99.).DOI:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17987-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17987-2)

REDMAN CW, SARGENT IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308(5728):1592–1594. Doi: 10.1126/ science.1111726

RICCI, R. Laser de Baixa Intensidade a Nível Celular. In: Chavantes MC (ed.). *Laser em Bio-Medicina*. Atheneu, São Paulo: 2009. Cap.7, p. 100-109.

ROBERTS JM, TAYLOR RN, MUSCI TJ, RODGERS GM, HUBEL CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:1200

ROBERTS JM, GAMMIL HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension*. 2005; 46:1243-9.).

ROBERTS JM, HUBEL CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta* 2009;30(Suppl A):S32–S37. Doi: 10.1016/j.placenta.2008.11.009

SKJAERVEN, R.; VATTEN, L.J.; WILCOX, A.J.; RØNNING, T.; IRGENS, L.M.; LIE, R.T. Recurrence of pre-eclampsia across generations: Exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ* 2005, 331, 877. [CrossRef]

TOMIMATSU, T, et al..Preeclampsia: Maternal Systemic Vascular Disorder Caused by Generalized Endothelial Dysfunction Due to Placental Antiangiogenic. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4246; doi:10.3390/ijms20174246)

TOMIMURA, S. Avaliação do Estresse Oxidativo e Modulação Autonômica Cardiovascular pós-Irradiação de Laser de Baixa Intensidade em Ratos Espontaneamente Hipertensos: Estudo Experimental [Tese] Dissertação Mestrado em Biofotônica. Universidade Nove de Julho, 2013

TOMIMURA, S., BIANCA PASSOS ASSUMPCÃO SILVA, IRIS CALLADO SANCHES, MARINA CANAL, FERNANDA CONSOLIM-COLOMBO, FELIPE FERNANDES CONTI, KATIA DE ANGELIS, MARIA CRISTINA CHAVANTES. Hemodynamic Effect of Laser Therapy in Spontaneously Hypertensive Rats. *Arq. Bras. Cardiol.* 2014; 103(2):161-164.

TOMIYAMA, H.; YAMASHINA, A. Non-invasive vascular function tests: Their pathophysiological background and clinical application. *Circ. J.* 2010, 74, 24–33.

T.E. GILLON, A. PELS, P. VON DADELSZEN, K. MACDONELL, L.A. MAGEE, Hypertensive disorders of pregnancy: a systematic review of international clinical practice guidelines, *PLoS One* (2014)

WANG A, RANA S, KARUMANCHI SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:147-158. doi:10.1152/physiol.00043.2008)

WANG, Y, SHI D, CHEN L.. Lipid profile and cytokines in hypertension of pregnancy: A comparison of preeclampsia therapies. PMID: 29316154 DOI: 10.1111/jch.13161)

WEISSGERBER, T.L.; MILIC, N.M.; MILIN-LAZOVIC, J.S.; GAROVIC, V.D. Impaired flow-mediated dilation before, during, and after preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Hypertension* 2016, 67, 415–423.

WHO - World Health Organization. WHO Recommendations for Prevention and Treatment of Pre-Eclampsia and Eclampsia. Geneva: World Health Organization; 2011)

WILLIAMS JP, PIPKIN FB. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011; 25(4-4): 405–417.)

YANG GU, DAVID F. LEWIS, YANPING ZHANG, LYNN J. GROOME, AND YUPING WANG. Increased Superoxide Generation and Decreased Stress Protein Hsp90 Expression in Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells (HUVECs) from Pregnancies Complicated by Preeclampsia Hypertens Pregnancy. 2006 ; 25(3): 169–182. doi:10.1080/10641950600912950)

YU, W.; GAO, W.; RONG, D.; WU, Z.; KHALIL, R.A. Molecular determinants of microvascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. *Microcirculation* 2019, 26, e12508).