



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Alterações antropométricas, hemodinâmicas, hematológicas e bioquímicas na pré-eclâmpsia

Aluna: **Márcia Aires Rodrigues de Freitas**

**UBERLÂNDIA, MG
29 de Setembro de 2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Alterações antropométricas, hemodinâmicas, hematológicas e bioquímicas na pré-eclâmpsia

Aluna: **Márcia Aires Rodrigues de Freitas**
Orientador: **Nilson Penha-Silva**
Co-orientadora: **Angélica Lemos Debs Diniz**

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Genética e Bioquímica (área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA, MG
29 de Setembro de 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- F866a
2017 Freitas, Márcia Aires Rodrigues de, 1976-
 Alterações antropométricas, hemodinâmicas, hematológicas e
 bioquímicas na pré-eclâmpsia / Márcia Aires Rodrigues de Freitas. -
 2017.
 118 f. : il.
- Orientador: Nilson Penha-Silva.
 Coorientadora: Angélica Lemos Debs Diniz.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.46>
 Inclui bibliografia.
1. Bioquímica - Teses. 2. Pré-eclâmpsia - Teses. 3. Sangue - Exame -
 Teses. 4. Eritrócitos - Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Diniz, Angélica
 Lemos Debs. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
 Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Alterações antropométricas, hemodinâmicas, hematológicas e bioquímicas na pré-eclâmpsia

Estudante: **Márcia Aires Rodrigues de Freitas**

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:	Dr. Nilson Penha-Silva	[UFU]
Examinador:	Dr. Edward Araújo Júnior	[UNIFESP]
Examinadora:	Dra. Elaine Christine Dantas Moisés	[USP]
Examinadora:	Dra. Cássia Regina da Silva	[UFU]
Examinadora:	Dra. Natássia Caroline Resende Corrêa	[UFU]

Data da defesa: **29/09/2017**

As sugestões da comissão examinadora e as normas do PPGGB para o formato da tese foram contempladas.

Nilson Penha-Silva
(Orientador)

“As verdadeiras ciências são aquelas que a experiência fez penetrar através dos sentidos, silenciando a língua dos litigantes, e que não adormecem seus pesquisadores, mas sempre procedem a partir de verdades primordiais e princípios notórios...”

Leonardo da Vinci.

DEDICATÓRIA

Aos obstinados pesquisadores em pré-eclâmpsia

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nilson Penha-Silva, meu orientador, agradeço a presença constante e serena em minha formação tanto profissional quanto pessoal.

À Profa. Dra. Angélica Lemos Debs Diniz, minha co-orientadora, agradeço as valiosas contribuições para esta pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Célia Santos, chefe do Serviço de Gestação de Alto Risco, obrigada pelo apoio e incentivo ao meu desenvolvimento científico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Miguel Hernandes Netto, chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, obrigada por todo suporte durante a preparação da tese.

  Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues, coordenadora da Pós-Graduação do Instituto de Genética e Bioquímica agradeço pelo esforço contínuo em manter a excelência da mesma, onde importantes trabalhos estão sendo realizados.

À minha analista Denise Rosa Goulart, meu agradecimento por todo o apoio emocional necessário para o desenvolvimento desta tese.

Aos colegas do Laboratório de Biofísicoquímica, minha querida família LaBFiQ, Alice Vieira da Costa, Carla Cristina Alves Andrade, Flaviana Ferreira Gomes, Jaqueline Aim  dos Reis Vilela, Lara Ferreira Paraíso, , Lucas Moreira Cunha , Lucas Tadeu de Andrade, Luciana Alves de Medeiros, Kely Raspante Teixeira, Marcelo Costa Júnior, Marco Aurélio Ferreira de Jesus Leite, Maria Aparecida Knychala, Mario da Silva Garrote-Filho, Morun Bernardino Neto, Ricardo Rodrigues, Rodney Coelho da Paixão, Rosiane Soares Saturnino, Ubirajara Coutinho Filho, Wener Barbosa Resende, agradeço pelos r cas discussões em diferentes áreas do conhecimento e pela agradável convivência diária.

 s colegas Daniele Alves de Oliveira, Emília Vaz de Rezende, Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo, L via Maria Alves, Lorraine Cristina Polloni, Márcia Marquez Silveira, Mariana Alves Pereira Z ia, Patrícia Alves Terra, Nayara Araújo e aos professores da pós-graduação do Instituto de Genética e Bioquímica, especialmente Ana Maria Bonetti, Ana Graci Brito Maduro, João Maduro, Malcon Ant nio Manfredi Brandenburgo e Vivian Alonso Goulart, agradeço a amizade e momentos de estudos compartilhados.

  Janaina de Souza Mota, secret ria da pós-graduação, muito obrigada pela disponibilidade e grande carinho comigo.

Aos funcionários do Instituto de Genética Bioquímica, Maria Conceição Francisco Souto dos Santos, Paulo Roberto Moderno e Sebastiana Abadia In cio pelo acolhimento diário.

 s colegas do Serviço de Gesta o de Alto Risco, Ana Paula Lino Jorge, Giseli de Fátima Anjos e Sandra Regina Xavier Santos, agradeço pela convivência e pelo compartilhamento de inquietudes, que é de onde nascem as pesquisas.

Aos funcionários da Maternidade que contrib  ram para realização desse estudo, minha gra  os.

Às participantes da pesquisa, agradeço pela confiança e disponibilidade em colaborarem com o desenvolvimento científico.

Aos meus pais, Gerson Rodrigues de Freitas (*in memoriam*) e Heloísa Aires Rodrigues de Freitas, grandes estimuladores de meu aperfeiçoamento técnico e humano.

Aos meus irmãos, Elisa Aires Rodrigues de Freitas e Paulo Henrique Aires de Freitas, e minha querida Marli Cecília de Souza, obrigada pelo apoio em todos os momentos.

Às minhas amigas Adriana Duarte de Godoy, Ana Paula Borges Vasconcelos, Andrea Silveira Rodrigues, Franya Bastos de Freitas, Letícia Carolina Korndorfer, Nathália Guimarães Von Krüger e Priscila Nunes Nascimento, agradeço pelo companheirismo e por se fazerem presentes nesta fase, com lanches, telefonemas e palavras de incentivo.

À Universidade Federal de Uberlândia, que me acolheu na residência médica em Ginecologia e Obstetrícia e possibilitou todo o suporte necessário para minha pós-graduação *stricto sensu* (mestrado e, agora, doutorado), muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
Abreviaturas	X
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiii
Apresentação	1
Capítulo 1 [Fundamentação Teórica]	3
Da embriogênese à placentação.....	4
Anormalidades no desenvolvimento placentário	6
Fatores angiogênicos e antiangiogênicos na pré-eclâmpsia.....	6
Pré-eclâmpsia e peroxidação lipídica	7
Disfunção endotelial na pré-eclâmpsia.....	8
O papel da obesidade na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.....	9
Epidemiologia da pré-eclâmpsia.....	10
Pré-eclâmpsia: fatores de risco	10
Pré-eclâmpsia: diagnóstico	11
Classificação da pré-eclâmpsia quanto ao início de sua instalação	11
Visão geral da fisiopatologia da pré-eclâmpsia.....	12
Alterações cardiovasculares	12
Alterações renais	12
Alterações hematológicas	12
Trombocitopenia	14
Alterações hepáticas	15
Acometimento cerebrovascular na pré-eclâmpsia	16
Composição e estrutura das membranas biológicas.....	17
Teor de colesterol de membrana de eritrócitos e níveis de colesterol plasmático	17
Propriedades da membrana eritrocitária.....	18
A estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos	20
A cinética de lise mecânica dos eritrócitos.....	21
Estabilidade osmótica de eritrócitos na pré-eclâmpsia	23
Fisiologia do fluxo sanguíneo.....	23
Efeito Doppler	24
Avaliação dopplervelocimétrica do território central	25
Anatomia da artéria oftálmica	24
Dopplervelocimetria da artéria oftálmica	25
Dopplervelocimetria da artéria oftálmica na pré-eclâmpsia	26
Considerações finais.....	28
Referências	29
Capítulo 2 [Are there differences in the anthropometric, hemodynamic, hematologic and biochemical profiles between late- and early-onset preeclampsia?]	49
Resumo	50
Abstract	51
Introduction	52
Material and Methods	53
Results.....	56
Discussion	59
Acknowledgements	65
References	66
Capítulo 3 [The role of the erythrocyte in the outcome of pregnancy with preeclampsia]	82
Resumo	83
Abstract	84
Introduction	85
Material e Methods.....	86
Results.....	89
Discussion	91
Conclusions	93
References	94

ABREVIATURAS

ALT	Alanina transferase, do inglês <i>Alanine Transaminase</i>
A _{min}	Absorvância com valor mínimo de hemólise
A _{max}	Absorvância com valor máximo de hemólise
A _{mma}	Platô máximo de absorvância na curva de lise cinética dos eritrócitos
AS	Superfície de Área,
AS/V	Superfície de Área/Volume
AST	Aspartato aminotransferases, do inglês <i>Aspartate Aminotransferases</i>
AO	Artéria oftálmica
BBB	Barreira hematoencefálica, do inglês <i>Brain Blood Barrier</i>
C	Grupo controle
KB	Corpos cetônicos, do inglês <i>Ketonic Bodies</i>
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
dX	¼ da Variação na concentração salina necessária para promover 100% de hemólise
EDV	Velocidade Diastólica Final, do inglês <i>End-Diastolic Velocity</i>
ET1	Endotelina-1, do inglês <i>Endothelin-1</i>
EOPE	Pré-eclâmpsia de início precoce, do inglês <i>Early Onset Preeclampsia</i>
EVT	Trofoblasto extraviloso, do inglês <i>Extravillous Trophoblast</i>
Flt-1	do inglês <i>fms-like tyrosin</i>
FFA	Ácidos Graxos Livres, do inglês <i>Free Fatty Acids</i>
H0	Concentração de NaCl que inicia a hemólise
H50	Concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise
H100	Concentração de NaCl capaz de promover 100% de hemólise
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL-C	Colesterol da Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>High Density Lipoprotein cholesterol</i>
HELLP	do inglês <i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count</i>
HIF-1	Fator induzido de Hipóxia 1, do inglês <i>Hypoxia Inductible fator type 1</i>
ICAM-4	do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule 4</i>
RI	Índice de Resistência, do inglês <i>Resistive Index</i>
KB	Corpos cetônicos, do inglês <i>Ketone Bodies</i>
K _M	Constante de meia saturação de uma enzima
LaBFiQ	Laboratório de Biofísicoquímica da Universidade Federal de Uberlândia
LDH	Lactato Desidrogenase, do inglês <i>Lactate Dehydrogenase</i>
LDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês <i>Low Density Lipoprotein Cholesterol</i>
LOPE	Pré-eclâmpsia de início tardio, do inglês <i>Late Onset Preeclampsia</i>
LOX-1	do inglês <i>Lecitin-Like Oxidized LDL receptor-1</i>
NO	Óxido nítrico, do inglês <i>Nitric Oxide</i>
MDA	Malondialdeído, do inglês <i>Malondialdehyde</i>
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média, do inglês <i>Mean Corpuscular Hemoglobina Concentration</i>
MCV	Volume corpuscular médio, do inglês <i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Radical ânion Superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONNO ⁻	Peroxidnitrito
OVP	Onda de Velocidade de Pulso
ox-LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade oxidada
PE	Pré-eclâmpsia, do inglês <i>preeclampsia</i>
PI	Índice de Pulsatilidade, do inglês <i>Pulsatility Index</i>
PIGF	do inglês <i>Placental Growth Fator</i>
PGI ₂	Prostaciclina, do inglês <i>Prostacyclin</i>

P2	do inglês, <i>secondy velocity peak</i>
PR	do inglês <i>Peak Ratio</i>
PRES	do inglês <i>Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome</i>
PS	Fosfatidilserina do inglês <i>Phosphatidylserine</i>
PSV	Pico de Velocidade Sistólica, do inglês <i>Peak Systolic Velocity</i>
PUFAs	Ácidos Graxos Polinsaturados do inglês <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
PWV	Onda de Velocidade de Pulso, do inglês <i>Pulse Wave Velocity</i>
RBC	Células Vermelhas do Sangue, do inglês <i>Red Blood Cells</i>
RDW	do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i>
RNE	Espécies reativas de nitrogênio, do inglês <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
sEndogolin	do inglês <i>soluble endogolin</i>
sFlt-1	do inglês <i>soluble fms-like tyrosin</i>
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
SNC	Sistema Nervoso Central
t	Tempo
t _{1/2}	Tempo transcorrido para ocorrência de metade da lise total
TGC	Triglicerídeos, do inglês <i>Triglycerides</i>
TGF-β1	do inglês, <i>Transforming Growth Factor beta-1</i>
TGF-β3	do inglês, <i>Transforming Growth Factor beta-3</i>
VDLD-C	Colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês <i>Very Low Density Lipoprotein Cholesterol</i>
VEGF	do inglês, do inglês <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
Vmean	Velocidade média de um ciclo cardíaco

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1	Representação esquemática da invasão do trofoblasto endovascular nas artérias espiraladas na gestação normal e na gestação complicada por pré-eclâmpsia após a 12 ^a semana de gestação 40
Figura 1.2	Representação esquemática da ligação normal entre o VEGF, PlGF e TGF- β 1 em seu receptor de membrana celular. Em seguida, a interceptação dos agentes antiangiogênicos por sFlt-1 e s-endogolín 41
Figura 1.3	Principais alterações fisiopatológicas da pré-eclâmpsia 42
Figura 1.4	Imagens do aparelho desenvolvido para análise de lise mecânica de eritrócitos por estresse mecânico 43
Figura 1.5	Gráfico ilustrativo do efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática 44
Figura 1.6	Imagem ultrassonográfica da órbita e estruturas retro-orbitárias com superposição de color Doppler para identificação da artéria oftálmica (AO) 45
Figura 1.7	Representação esquemática da variação na velocidade do fluxo sanguíneo na artéria oftálmica em razão do tempo de duração de um ciclo cardíaco 46
Figura 2.1	Typical curve of osmotic stability of erythrocytes 78
Figura 2.2	Graphical representation of the Doppler velocimetry of ophthalmic artery 79
Figura 2.3	Representation of Doppler velocimetry of ophthalmic artery in a normotensive volunteer (PR = 0.56; P2 = 24.25) (a) and in volunteers with late-onset (LOPE: PR = 0.78; P2 = 25.24) (b) and early-onset (EOPE = 0.93; P2 = 35.23) (c). PR is the P2/PSV ratio and P2 is the second peak systolic velocity 80
Figura 2.4	Mechanical selection and increased osmotic stability of erythrocytes in preeclampsia 81
Figura 3.1	Typical curve of hyposmotic lysis of erythrocytes, with definition of the osmotic stability variables $A_{\min}$, $A_{\max}$, H_0 , H_{50} , H_{100} , and dX 102
Figura 3.2	Typical curve obtained in the kinetics of erythrocyte lysis, with definition of the kinetic variables $t_{1/2}$ and $A_{\max}$ 103
Figura 3.3	Doppler velocimetry of the ophthalmic artery of a pregnant woman with preeclampsia 104
Figura 3.4	Illustration of aggregation of erythrocytes with larger volumes in the bloodstream of women with pre-eclampsia 105

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1	Fatores de risco para pré-eclâmpsia 47
Tabela 1.2	CrITÉrios diagnÓsticos da pré-eclâmpsia 48
Tabela 2.1	Comparisons of the values of variables from normotensive pregnant women and pregnant women with late onset preeclampsia (LOPE) and early onset preeclampsia (EOPE), presented as frequency*, median $\pm$ IQR [§] or mean $\pm$ SD [†] , at the third trimester of pregnancy 73
Tabela 2.2	Values of Spearman σ coefficients for the correlations between all pairs of variables in the group of normotensive pregnant women 75
Tabela 2.3	Values of Spearman σ coefficients for the correlations between all pairs of variables in the group of pregnant women with late onset preeclampsia 76
Tabela 2.4	Values of Spearman σ coefficients for the correlations between all pairs of variables in the group of pregnant women with late early preeclampsia 77
Tabela 3.1	Baseline of characteristics of the study population 98
Tabela 3.2	Values of Spearman σ coefficients for the correlations between all pairs of variables in pregnant women with preeclampsia 100

APRESENTAÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome multifatorial complexa e de etiologia ainda não esclarecida. A agressão oxidativa ao endotélio, levando a inflamação e culminando em aumento na resistência vascular, com consequente elevação na pressão arterial, constitui um dos mecanismos aceitos para explicar a instalação dessa doença.

Múltiplos órgãos são afetados pela PE, mas o acometimento cerebral é a complicação materna mais séria e potencialmente fatal. Vários autores, utilizando a dopplervelocimetria da artéria oftálmica, identificaram a presença de vasodilatação cerebrovascular na PE. Acredita-se que a hiperperusão do território cerebral esteja envolvida na fisiopatologia do acometimento do Sistema Nervoso Central (SNC) pela pré-eclâmpsia.

O controle do fluxo sanguíneo está diretamente associado à perfusão tecidual e o eritrócito tem uma função ativa nesse processo. Para o bom desempenho de suas funções, o eritrócito deve ser capaz de sofrer extensa deformação passiva, mas sem sofrer lise, ao passar por capilares de pequeno calibre. Isso é possível graças às propriedades da membrana eritrocitária: deformabilidade, viscoelasticidade, fluidez e estabilidade.

O Laboratório de Biofísicoquímica (LaBFiQ) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) tem padronizado métodos para estudo da estabilidade de membrana de eritrócitos *in vitro* em diversas situações. Nesse trabalho, a estabilidade de membrana de eritrócitos de gestantes com PE e gestantes normotensas, no terceiro trimestre de gestação, foi investigada mediante exposição a estresse osmótico e submissão a agressão mecânica.

Esses métodos foram utilizados nesta tese para compreender melhor a fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Para isso, variáveis de estabilidade osmótica e mecânica de eritrócitos foram investigadas, juntamente com variáveis antropométricas, hemodinâmicas, hematológicas e bioquímicas.

O **Capítulo 1** refere-se à fundamentação teórica da tese. Nesse capítulo, estão descritos os principais marcos relacionados ao desenvolvimento da placenta na gestação normal e na PE. Esse capítulo também traz uma breve revisão sobre epidemiologia da doença, uma apresentação de seus fatores de risco e de sua vinculação com a disfunção vascular. Como a tese investiga a inserção dos eritrócitos no contexto da doença, uma revisão sobre características estruturais e comportamentais destas células também se faz presente. Além disso, há uma apresentação sobre a velocimetria fundamentada no efeito Doppler na artéria oftálmica, uma vez que esse método é de grande utilidade na avaliação da pré-eclâmpsia.

O **Capítulo 2** investiga a patogênese da pré-eclâmpsia à luz de sua classificação em PE de início precoce (EOPE) e PE de início tardio (LOPE), quando a mesma se desenvolve antes ou após 34 semanas, respectivamente. Essa classificação parece refletir mecanismos etiopatogênicos que se iniciam em momentos diferentes da gestação. Portanto, o objetivo desse capítulo foi investigar se há diferenças antropométricas, hemodinâmicas, hematológicas e bioquímicas entre gestantes com pré-eclâmpsia (13 com EOPE e 23 com LOPE) em relação a um grupo controle (C) constituído por 29 gestantes normotensas no momento do parto, no sentido de tentar estabelecer as possíveis associações existentes entre as variáveis.

Por último, o **Capítulo 3** incorporou a avaliação da cinética de lise mecânica de eritrócitos na análise do desfecho gestacional da PE por meio da análise de correlações das variáveis antropométricas, hemodinâmicas, hematológicas e bioquímicas em uma população de 15 pacientes com pré-eclâmpsia.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

Da embriogênese à placentação

O desenvolvimento da placenta e do feto, que se inicia na fecundação e formação do zigoto, é um processo contínuo durante a gravidez. Na tuba uterina, o zigoto passa pelos processos de clivagem, divisão de blastômeros e formação da mórula, a qual irá atingir a cavidade uterina no terceiro dia após a fecundação. No interior da mórula, há a formação de uma cavidade preenchida de líquido - denominada de cavidade blastocística - com separação dos blastômeros em duas partes: a massa celular interna (denominada de embrioblasto), que irá formar o embrião e a cavidade amniótica, e a massa celular externa (denominada de trofoblasto), que originará a placenta e as membranas fetais. Neste momento, a mórula passa a ser chamada de blastocisto e encontra-se submersa na cavidade uterina. No sexto dia, após a fertilização, o blastocisto adere ao epitélio endometrial ([Moore, Persaud, & Torchia, 2012](#); [Silva Filho, 2017](#); [Zugaib, 2008](#)).

Após a implantação no endométrio, o trofoblasto se diferencia em duas linhagens celulares com funções distintas quando em contato com tecido materno: trofoblasto viloso/sinciotrofoblasto e citotrofoblasto extraviloso (EVT). O sinciotrofoblasto é um sincício multinucleado, de localização externa na diferenciação do trofoblasto, constituído de citoplasma sem limites celulares e com núcleos polimorfos. É descrito como um epitélio especializado no transporte de gases, nutrientes, eliminação de resíduos e síntese de hormônios. Já o EVT é uma camada de células mononucleares, de localização interna na diferenciação do trofoblasto, e possui células germinativas com elevada capacidade de proliferação e invasão no tecido materno. O EVT diferencia-se em componentes proliferativos e invasivos. Estes, ao invadirem a decídua e miométrio, são chamados de EVT intersticial e, ao penetrarem nas artérias espiraladas, são denominados de EVT endovascular ([Burton, Hempstock, & Jauniaux, 2001](#); [Burton & Jauniaux, 2004](#); [Caniggia, Winter, Lye, & Post, 2000](#)).

Em torno do 8º dia, pós-fertilização, surgem pequenos espaços isolados no interior do sinciotrofoblasto que se fundem para formar as lacunas. Essas são preenchidas por sangue materno e secreção de glândulas endometriais erodidas. Em um embrião de 12 dias, as lacunas adjacentes se fundem e dão origem à rede lacunar (primórdios do espaço viloso da placenta). Em seguida, o sinciotrofoblasto promove a erosão de vasos sanguíneos endometriais, permitindo que o sangue materno flua para dentro da rede lacunar, estabelecendo, assim, a circulação uteroplacentária primitiva ([Silva Filho, 2017](#)).

Ao final da segunda semana pós-fecundação, o sinciotrofoblasto sofre a invaginação do EVT e, assim, formam-se as vilosidades coriônicas primárias. Os cordões mesenquimais,

derivados do mesoderma extraembrionário, invadem o eixo central das vilosidades primárias, constituindo as vilosidades secundárias. A partir da terceira semana, pós-fecundação, ocorre a angiogênese no mesoderma extraembrionário e formam-se as vilosidades terciárias (Silva Filho, 2017). As ramificações das vilosidades coriônicas da placenta resultam em uma área maior onde substâncias podem ser trocadas através de uma fina membrana/barreira interposta entre as circulações fetal e materna (Charnock-Jones & Burton, 2000). Os lúmens dos vasos uteroplacentários estão ocluídos por *plugs* de trofoblastos vasculares até o final do primeiro trimestre e, assim, ocorre somente a entrada de plasma no espaço intervilo (Hustin & Schaaps, 1987; Lorquet, Pequeux, Munaut, & Foidart, 2010). Essa oclusão permite que a fase inicial do desenvolvimento placentário e fetal transcorra em um ambiente com baixa concentração de oxigenação. Dessa forma, evita-se o efeito teratogênico de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Burton et al., 2001; Burton, Hempstock, & Jauniaux, 2003). Entre 10 e 14 semanas de gestação, há o deslocamento dos *plugs* trofoblásticos vasculares e estabelece-se, assim, o fluxo sanguíneo no espaço intervilo, com início da nutrição hemotrófica (Caniggia et al., 2000).

O oxigênio é o principal regulador da invasão trofoblástica no tecido materno. No início da gestação, devido ao limitado fluxo sanguíneo no espaço intervilo, o desenvolvimento placentário ocorre em condições de baixa oxigenação. Nesse sentido, há elevada quantidade de fator induzido de hipóxia 1 (HIF-1) e fator de crescimento transformante beta-3 (TGF- β 3) que são inibidores da diferenciação do trofoblasto extraviloso em seu fenótipo invasor. Após o estabelecimento do fluxo sanguíneo no espaço intervilo, há o aumento da concentração de oxigênio na placenta o que gera redução nas concentrações de HIF-1 e TGF- β 3. Em consequência disso, o EVT endovascular rompe a membrana basal, invade a decídua basal do endométrio, penetra na parede das artérias espiraladas e promove a substituição tanto da camada muscular quanto do endotélio por células trofoblásticas. Consequentemente, formam-se artérias uteroplacentárias largas, constituindo um ambiente de baixa resistência vascular. Isso permite que as trocas de gases e nutrientes ocorram com maior eficiência (Burton et al., 2001, 2003; Caniggia et al., 2000).

Os estudos anatômicos relacionados à formação da placenta indicam que o desenvolvimento dos vasos uteroplacentários ocorre por meio de duas ondas ou estágios de invasões trofoblásticas. Antes da 12ª semana de gestação, dá-se a primeira onda, com a invasão e remodelação das artérias espiraladas da decídua até o limite do miométrio. E a segunda, ocorre entre a 12ª e a 16ª semana de gestação, e envolve algum grau de invasão de segmentos intramiométriais das artérias espiraladas (Silva Filho, 2017). De maneira geral, as modificações

dos vasos uteroplacentários envolvem os seguintes processos: substituição do endotélio e de células musculares da camada média das artérias espiraladas por EVT; perda da elasticidade; dilatação e alargamento das artérias; supressão de sua contratilidade e perda de seu controle vasomotor (Kaufmann, Black, & Huppertz, 2003).

Anormalidades no desenvolvimento placentário

Há estudos apontando a placenta como uma peça fundamental para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia (Huppertz, 2008). Acredita-se que, nessa doença, ocorra um defeito no mecanismo de invasão trofoblástica com diferenciação incompleta do EVT em seu fenótipo invasivo endovascular e, assim, as artérias espiraladas não são invadidas em sua totalidade e, portanto, não formam as artérias uteroplacentárias largas e de baixa resistência (Kaufmann et al., 2003) (Figura 1.1).

Diante de uma invasão trofoblástica deficiente, ocorre um mau controle da regulação do oxigênio no espaço intervilloso em fases iniciais do desenvolvimento placentário e, assim não ocorre a remodelação das artérias espiraladas e, conseqüentemente, há persistência de um território vascular de alta resistência. Dessa forma, as vilosidades coriônicas são banhadas por “jatos intermitentes” de sangue sob alta pressão. Processo semelhante ao que ocorre em situações de isquemia/-reperfusão. Esse tipo de injúria é marcado por a produção exagerada de ROS e RNS (espécies reativas de nitrogênio). A produção de ROS é caracterizada pela geração de moléculas de superóxido ($O_2^{\cdot -}$) que, em situações de ausente ou insuficiente capacidade tecidual antioxidativa, desencadeiam uma cascata de eventos com maior produção de ROS e peroxidação lipídica. Todas essas moléculas levam à resposta , provocam ativação leucocitária, adesão plaquetária, vasoconstrição e resposta inflamatória generalizada (L. G. de Oliveira, Karumanchi, & Sass, 2010).

Fatores angiogênicos e antiangiogênicos na pré-eclâmpsia

Os principais fatores angiogênicos que desempenham papéis fundamentais na manutenção da homeostase endotelial são o VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*), PlGF (do inglês *placental growth factor*) e TGF- β 1 (do inglês *tissue growth factor* β 1). O VEGF participa da manutenção endotelial por meio do receptor com atividade tirosina-

quinase Flt-1 (do inglês *fms-like tyrosin*), que também pode se ligar ao PIGF (Charnock-Jones & Burton, 2000).

Já o TGF- β 1 liga-se ao complexo formado por receptor de TGF- β tipo I (Charnock-Jones & Burton, 2000).

O VEGF e o TGF- β 1 são responsáveis por estabilizar a célula endotelial de novos vasos sanguíneos. Já o PIGF é predominantemente expresso nos trofoblastos e estimula a angiogênese em situações de hipóxia e isquemia placentária (L. G. de Oliveira et al., 2010).

Na presença de estresse oxidativo, ocorre uma maior produção placentária de fatores antiangiogênicos como o sFlt-1 (do inglês *soluble fms-like tyrosin*) e a sEndogolin (do inglês, *soluble endogolin*). O sFlt-1 é um receptor solúvel que se forma por *splicing* alternativo, o que leva à perda da porção transmembrana do Flt-1. O sFlt-1 fixa-se aos fatores circulantes VEGF e PIGF, o sFlt-1 impede que essas moléculas se liguem aos seus receptores na membrana celular, inibindo a angiogênese. Por sua vez, a sEndogolin age de forma semelhante ao sFlt-1, impedindo a ação angiogênica de seu ligante TGF- β 1 (Charnock-Jones & Burton, 2000; L. G. de Oliveira et al., 2010) (**Figura 1.2**).

Pré-eclâmpsia e peroxidação lipídica

Os eritrócitos são bastante vulneráveis às espécies reativas de oxigênio (ROS), pois os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) da sua membrana são susceptíveis à peroxidação lipídica. Esse processo leva a modificações físico-químicas na bicamada lipídica da membrana eritrocitária, gerando prejuízos à fluidez e, assim sendo, perturbações a sua estabilidade.

A lipoperoxidação inicia-se quando um radical livre captura um átomo de hidrogênio de um carbono insaturado do ácido graxo. Dessa forma, haverá um elétron não emparelhado no ácido graxo, o que o torna capaz de capturar oxigênio e formar o radical peroxil. Os peróxidos lipídicos são instáveis e decompõem-se em compostos secundários de carbono altamente reativos, como o malondialdeído (MDA) (Constantinescu, Han, & Packer, 1993; Dordevic et al., 2008).

A peroxidação de lipídeos e as modificações na antigenicidade de proteínas de membrana aceleram a degeneração do eritrócito e sua remoção precoce da circulação sanguínea. A ocorrência de hemólise leva à liberação de ferro a partir da hemoglobina e o ferro pode sofrer a chamada reação de Fenton com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), levando à formação do radical hidroxila ($HO^\bullet$), que dá início a uma cascata de dano oxidativo (Abad et al., 2010).

O teste de estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos é um bom indicador da extensão do comprometimento celular pela peroxidação lipídica (Spickett et al., 1998).

Na PE, o aumento do estresse oxidativo placentário é responsável por maior conversão de LDL em LDL oxidada (ox-LDL). A oxLDL, por apresentar maior carga negativa que a LDL nativa, liga-se seletivamente ao LOX-1 (do inglês *lecitin-like oxidized LDL receptor-1*) que encontra-se predominantemente expresso em células endoteliais, gerando disfunção vascular (Schreurs, Hubel, Bernstein, Jeyabalan, & Cipolla, 2013).

A LOX-1 ativada estimula rapidamente a célula endotelial, via ativação de NADPH oxidase, a produzir superóxido, o qual se liga ao óxido nítrico (NO), resultando na produção de peroxinitrito (ONNO⁻). Essa partícula apresenta efeitos deletérios à célula endotelial (Cominacini et al., 2001).

A agressão ao endotélio, gerada pelo excesso de peroxinitrito na circulação sanguínea de pacientes com PE, constitui uma teoria para a geração da disfunção endotelial na PE (Sankaralingam, Xu, Sawamura, & Davidge, 2009).

Disfunção endotelial na pré-eclâmpsia

Vários estudos propuseram a disfunção celular endotelial difusa materna como evento-chave da PE (Amaral, Cunningham, Cornelius, & LaMarca, 2015; Barbosa et al., 2010; Bell, 2010). Acredita-se que o trofoblasto pobremente perfundido elabore substâncias tóxicas para a célula endotelial. No entanto, a natureza exata dessas substâncias permanece desconhecida. As células endoteliais, quando injuriadas, perdem suas funções normais, diminuindo a produção de substâncias vasodilatadoras, como óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), e começam a manifestar outras funções, as quais envolvem a produção de substâncias constritoras (como a endotelina ET1 e a prostaglandina PGH₂), pró-coagulantes (como o tromboxano TXA₂) e mitogênicas (Kahhale & Zugaib, 2013).

Além disso, o endotélio torna-se mais sensível à ação da angiotensina II, gerando vasoespasmo generalizado. Consequentemente, há um aumento dos níveis pressóricos na tentativa de manter o fluxo sanguíneo em um sistema vascular de elevada resistência (AbdAlla, Lother, el Massiery, & Qutterer, 2001).

Vários autores descreveram a persistência da disfunção endotelial após o episódio de PE. Isso ocorre porque o estado crônico de injúria celular endotelial está associado a fibrose e espessamento da camada lisa muscular dos vasos sanguíneos, aumentando a vulnerabilidade a doenças cardíacas e cerebrovasculares na 5ª década de vida em pacientes com antecedentes

de pré-eclâmpsia ([Amaral et al., 2015](#); [Bokslag et al., 2017](#); [Cipolla & Biller, 2017](#); [Siepmann et al., 2017](#)).

O papel da obesidade na fisiopatologia da pré-eclâmpsia

Na fase anabólica da gestação há uma discrepância na distribuição corporal de gordura, de acordo com o biotipo das gestantes. Em grávidas obesas, o acúmulo de gordura ocorre, predominantemente, em região abdominal e superior do corpo, fenômeno semelhante ao observado em portadores de síndrome metabólica. O armazenamento de gordura, em região central do corpo representa uma hipertrofia de adipócitos e uma falha no armazenamento adequado de ácidos graxos, resultando em lipotoxicidade. A associação entre o excesso de ácidos graxos livres e estresse oxidativo ocasiona a peroxidação lipídica. E isso pode causar prejuízos tanto à invasão trofoblástica e quanto à remodelação vascular das artérias espiraladas, predispondo à pré-eclâmpsia ([Brizzi et al., 1999](#); [Herrera, 2000](#); [Jarvie et al., 2010](#)).

No entanto, a obesidade pode provocar a ocorrência de pré-eclâmpsia mesmo na presença de uma placentação adequada. Uma das razões para isso é que na fase catabólica da gestação há mobilização de triglicerídeos armazenados em fase anterior. Embora a placenta não seja permeável aos TGCs, o feto beneficia-se deles pela utilização de seus dois metabólitos – os ácidos graxos livres (FFA) e os corpos cetônicos (CB) - que atravessam a placenta e servem de substrato energético e lipogênico ao feto, particularmente durante o jejum, quando a glicemia tende a declinar. Quando isso ocorre, sob a ação regulatória do glucagon, o fígado ativa a gliconeogênese e, para isso, exige maior aporte de FFA para fornecimento de energia através da β -oxidação. Isto exige a ativação da atividade da lipase hepática para favorecer a degradação de TGC. Nesta circunstância, a ocorrência simultânea da gliconeogênese e da β -oxidação favorece a cetogênese, com formação de mais corpos cetônicos. Ademais, durante o período de jejum prolongado, a mãe utiliza-se, preferencialmente, de corpos cetônicos como fonte de energia e mantém o aporte de glicose, proteínas e aminoácidos essenciais ao feto ([Jarvie et al., 2010](#)).

Ao final da gestação, há redução na atividade da lipoproteína lipase e aumento da ação da lipase hepática, resultando em hipertrigliceridemia e, conseqüentemente, aumento de VLDL-C e LDL-C. Entre 35 e 36 semanas de gestação, 97% das gestantes apresentam o sub-tipo pequeno e denso de LDL considerada altamente aterogênica ([Hubel, Lyall, Weissfeld, Gandley, & Roberts, 1998](#); [Jarvie et al., 2010](#)).

Esse subtipo de LDL tem uma maior tendência de sofrer oxidação na presença de ROS e, assim, formar ox-LDL. Uma vez que a obesidade está associada à inflamação crônica e maiores taxas de estresse oxidativo e peroxidação lipídica, as alterações fisiológicas da gestação encontram-se exacerbadas neste grupo de gestantes.

Epidemiologia da pré-eclâmpsia

Diferenças geográficas, econômicas e étnicas estão associadas ao risco desigual de morte materna, sendo que, em países desenvolvidos, a taxa é 1 a cada 3800, e 1 em 39 na África subsaariana ([Say et al., 2014](#)).

As desordens hipertensivas da gestação são responsáveis por, aproximadamente, 18% dos casos de morte materna; em números, isso representa 62.000 a 77.000 mortes/ano. Essas mortes são consideradas potencialmente evitáveis pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ([Abalos, Cuesta, Grosso, Chou, & Say, 2013](#); [Duley, 2009](#)).

Na América Latina e no Caribe, os distúrbios hipertensivos constituem a segunda causa de morte materna, perdendo, apenas, para as hemorragias do ciclo gravídico-puerperal ([Abalos et al., 2013](#)).

Segundo os últimos dados do Sistema de Informações sobre a Mortalidade (DATA-SUS-SIM-2018), no ano 2017 foram registradas 1421 mortes maternas no Brasil, tendo sido notificados 89 casos no estado de Minas Gerais (Ministério da Saúde; <http://svs.aims.gov.br/dantps/centrais-de-conteudos/infograficos/mortalidade/materna>, acessado em fevereiro/2018).

Já a eclâmpsia é responsável por 1,4% de todas as mortes maternas e apresenta taxas mais elevadas no continente africano ([Abalos et al., 2013](#)). No Brasil, a incidência de eclâmpsia foi 0,6%. No ano de 2010, foram registrados 167 casos de mortes por eclâmpsia ([Giordano et al., 2014](#)).

Pré-eclâmpsia: fatores de risco

Os principais fatores de risco da PE foram definidos em revisões sistemáticas e serão apresentados na forma de tabela (**Tabela 1.1**) ([Duckitt & Harrington, 2005](#)).

Pré-eclâmpsia: diagnóstico

A definição de pré-eclâmpsia nesse estudo foi baseada nos critérios adotados pelo Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia em 2013 ("[Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy](#)," 2013) (Tabela 1.2).

Classificação da pré-eclâmpsia quanto ao início de sua instalação

No final da década de 70 e início de 80, começaram as primeiras publicações estratificando a PE em duas doenças com base na idade gestacional do início dos sinais e sintomas da doença: PE de início precoce (EOPE) e PE de início tardio (LOPE), quando diagnosticada antes ou após 34 semanas de gestação, respectivamente ([Reis et al., 2010](#); [Valensise, Vasapollo, Gagliardi, & Novelli, 2008](#); [von Dadelszen, Magee, & Roberts, 2003](#)). Segundo dados epidemiológicos, a incidência de EOPE é 0.38% e de LOPE, 2.72% em todas as gestações ([Bahado-Singh et al., 2015](#); [Lisonkova & Joseph, 2013](#)).

A LOPE associa-se à placentação normal ou levemente alterada e a agressão ao endotélio placentário é secundária à doença materna, por isso denominada de PE materna. Essa forma de pré-eclâmpsia está associada a menor comprometimento clínico tanto fetal quanto materno ([Bahado-Singh et al., 2015](#)).

Já a EOPE reflete uma placentação inadequada, com a liberação de fatores antiangiogênicos e pró-oxidantes responsáveis por lesão endotelial e, por essa razão, é conhecida como PE placentária. É reconhecida como a forma grave da doença. A EOPE está relacionada a redução no volume placentário, maior comprometimento do crescimento e vitalidade fetal, anormalidades ao estudo da velocimetria por efeito Doppler nas artérias uterinas (presença de incisura protodiastólica e aumento do índice de pulsatilidade) e umbilical, e maior comprometimento sistêmico materno. Acredita-se que a EOPE seja de origem genética ([Lisonkova et al., 2014](#); [Valensise et al., 2008](#)).

A EOPE foi associada a maior risco de doença cardíaca e cerebrovascular na quinta década de vida quando comparada ao grupo LOPE ([Bokslag et al., 2017](#)).

Visão geral da fisiopatologia da pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia é uma doença multissistêmica, com agravamento progressivo, cuja cura é o parto ([Lorquet et al., 2010](#)).

Esta secção se limitou a trazer as principais repercussões hemodinâmicas, hematológicas, bioquímicas maternas da pré-eclâmpsia (**Figura 1.3**).

Alterações cardiovasculares

Os distúrbios cardiovasculares da PE caracterizam-se por estado hiperdinâmico e elevação da frequência cardíaca. A elevação da pós-carga, em função da hipertensão sistêmica, e redução da pré-carga, em consequência da hipovolemia, são características típicas da doença ([Zugaib, 2008](#)).

As mulheres com PE apresentam edema generalizado, decorrente do acúmulo extravascular de líquido. Essa retenção hídrica patológica está associada a lesão endotelial e a diminuição dos níveis de proteínas plasmáticas, em decorrência de proteinúria e/ou comprometimento hepático ([Margarson & Soni, 1998](#)).

Alterações renais

A presença de proteinúria e a redução da função renal são características associadas a pré-eclâmpsia ([Moran, Lindheimer, & Davison, 2004](#)).

A mais consistente anormalidade anatomopatológica associada à pré-eclâmpsia é o achado anatomopatológico renal de endoteliose glomerular. A tumefação do endotélio glomerular nessa doença é um dos primeiros indícios de que a célula endotelial é um dos alvos para a lesão em pacientes com PE ([Kahhale & Zugaib, 2013](#)).

A vasoconstrição sistêmica e a redução de fluxo sanguíneo renal são responsáveis pelo aumento de uréia, creatinina e ácido úrico ([Zugaib, 2008](#)).

Alterações hematológicas

A pré-eclâmpsia está associada a alterações em parâmetros reológicos do sangue. Os eritrócitos são bastante vulneráveis às espécies reativas de oxigênio (ROS), pois os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) da sua membrana são susceptíveis à peroxidação lipídica.

Esse processo leva a modificações físico-químicas na bicamada lipídica da membrana eritrocitária, gerando prejuízos à fluidez e, assim sendo, perturbações a sua estabilidade e prejuízo à deformabilidade eritrocitária (Heilmann, Rath, & Pollow, 2004).

A lipoperoxidação inicia-se quando um radical livre captura um átomo de hidrogênio de um carbono insaturado do ácido graxo. Dessa forma, haverá um elétron não emparelhado no ácido graxo, o que o torna capaz de capturar oxigênio e formar o radical peroxil. Os peróxidos lipídicos são instáveis e decompõem-se em compostos secundários de carbono altamente reativos, como o malondialdeído (MDA) (Constantinescu, Han, & Packer, 1993; Dordevic et al., 2008).

A peroxidação de lipídeos e as modificações na antigenicidade de proteínas de membrana aceleram a degeneração do eritrócito e sua remoção precoce da circulação sanguínea. A ocorrência de hemólise leva à liberação de ferro a partir da hemoglobina e o ferro pode sofrer a chamada reação de Fenton com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), levando à formação do radical hidroxila (HO^*), que dá início a uma cascata de dano oxidativo (Abad et al., 2010).

O teste de estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos é um bom indicador da extensão do comprometimento celular pela peroxidação lipídica (Spickett et al., 1998)

A exacerbação da peroxidação lipídica da membrana eritrocitária prejudica a atividade da Ca-ATPase, com consequente acúmulo de cálcio no citossol, resultando em diminuição da resistência osmótica e aumento da lise (Abad et al., 2010).

Em reposta à redução na osmolariedade plasmática da doença, há maior concentração intracelular de potássio, cálcio e outros osmólitos, o que provoca mudanças na composição dos eritrócitos, tornando-os susceptíveis à lise (Abad et al., 2010).

Observa-se, também, maior proporção de esquizócitos e equinócitos na PE em relação a gestantes normotensas. Especula-se que essas alterações na morfologia dos eritrócitos estejam diretamente relacionadas à maior hipercolesterolemia presente na doença. Uma vez que há constante *turnover* de colesterol entre a membrana do eritrócito e as lipoproteínas plasmáticas, a hipercolesterolemia produz aumento no teor de colesterol de membrana e, dessa maneira, promove alterações tanto no formato quanto na funcionalidade do eritrócito (Lurie & Mamet, 2000).

Para Lurie et al (2000), os eritrócitos de pacientes com PE não sofreriam as elevações fisiológicas no volume corpuscular médio (MCV) observado na gravidez normal. Dessa maneira, apresentariam o MCV discretamente maior quando comparados a mulheres não grávidas (Lurie & Mamet, 2000).

Para os mesmos autores, os macrófagos seriam disfuncionais na PE. Dessa maneira, haveria uma falha na remoção de eritrócitos senescentes. Isso seria responsável pelo tempo de vida do eritrócito na PE ser semelhante ao de mulheres não grávidas (Lurie & Mamet, 2000). Nesse sentido, na PE, é possível encontrar eritrócitos em diferentes idades, o que é responsável pelo aumento do RDW nessa doença. Ademais, o estado de hipercoagulabilidade foi, aparentemente, associado à persistência de eritrócitos senescentes na circulação de pacientes com PE (Lurie & Mamet, 2000).

A vasoconstrição sistêmica e lesão endotelial difusa, na PE, são responsáveis pelo estreitamento do lúmen de vasos sanguíneos e lise mecânica dos eritrócitos ao passarem por eles. Além do mais, na presença de ativação da cascata de coagulação, ocorre depósito de fibrinas na microcirculação e secção dos eritrócitos e, por consequência, exacerbação da hemólise mecânica, resultando em alterações na morfologia do eritrócito (com aparecimento de esquizócitos) (Hernandez Hernandez et al., 2015).

Na PE ocorre aceleração da eritropoiese - “de emergência” - com a diferenciação incompleta dos eritrócitos, na medula óssea, e maior liberação de reticulócitos na circulação (Lurie & Mamet, 2000).

Trombocitopenia

Uma das hipóteses mais aceitas para a ocorrência da trombocitopenia, na pré-eclâmpsia, é de origem imunológica. Verifica-se que uma maior ativação plaquetária gera a desgranulação e liberação de tromboxano A2 com diminuição de seu espectro de vida (Zugaib, 2008).

A maior depuração de plaquetas intensifica a produção e liberação precoce na circulação (Yucel & Ustun, 2017) de plaquetas com maiores volumes, Isso é responsável pelo aumento no volume plaquetário médio (MPV) (Burrows, Hunter, Andrew, & Kelton, 1987).

Alterações hepáticas

As lesões hepáticas estão presentes na PE grave e eclâmpsia, e são secundárias ao vasoespasma intenso, o que eleva o risco de infarto e hemorragia periportal. Isso resulta em aumento de aspartato aminotransferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) na circulação (Zugaib, 2008).

Há uma associação entre trombocitopenia, disfunção hepática e anemia hemolítica microangiopática. Essa combinação de alterações foi descrita pelo acrônimo de síndrome HELLP (do inglês, *Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count*), a qual é descrita nos casos PE grave e eclâmpsia (Stone, 1998).

Acometimento cerebrovascular na pré-eclâmpsia

Há duas teorias antagônicas propostas para o desenvolvimento de convulsões em pacientes com PE, ambas são baseadas no papel central da hipertensão. De acordo com o primeiro modelo, os níveis pressóricos aumentados superariam a força de vasoconstrição das artérias e arteríolas cerebrais, levando à perda da capacidade autorregulatória, com aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e edema cerebral hidrostático (Belfort, Giannina, & Herd, 1999; Cipolla, 2007; Hammer & Cipolla, 2015). No segundo modelo, a hipertensão causaria uma super-autorregulação, levando a vasoespasma, isquemia, hiperperusão e formação de edema cerebral (Marra et al., 2014).

As incertezas sobre a fisiopatologia da eclâmpsia ocorrem porque os achados clínicos envolvem variados graus de hemorragia, edema cerebral e vasculopatia (Marra et al., 2014). A associação entre a eclâmpsia e a síndrome da encefalopatia posterior reversível (PRES, do inglês *Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome*) (Barbosa et al., 2010) é reforçada pelas semelhanças tanto nas manifestações clínicas quanto nos achados radiológicos – presença de áreas simétricas de edema vasogênico na substância branca predominantemente em lobos cerebrais posteriores – descritos nessas duas condições patológicas. Ademais, há rápida reversibilidade dos sintomas quando os níveis pressóricos retornam à normalidade tanto na eclâmpsia quanto na PRES (Cipolla, Sweet, & Chan, 2011).

Segundo os trabalhos experimentais de Cipolla et al (2012), um perfil metabólico alterado seria capaz de aumentar o risco de eclâmpsia mesmo em pacientes com níveis pressóricos normais. Em seus estudos, níveis elevados de ox-LDL circulantes em pacientes com PE foram capazes de aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica em animais de laboratório (Barbosa et al., 2010; Chen, Masaki, & Sawamura, 2002).

Vários autores demonstraram a presença de hiperfluxo em território cerebral na PE, utilizando dopplervelocimetria intracranina (Belfort et al., 1999) e da AO (Takata, Nakatsuka, & Kudo, 2002).

Composição e estrutura das membranas biológicas

As membranas biológicas são complexos organizacionais que delimitam o meio intracelular, separando-o do meio extracelular. A membrana plasmática exerce o controle do transporte ativo e passivo de inúmeras substâncias, funcionando com uma barreira seletiva para manutenção da constância do meio intracelular (Mohandas & Gallagher, 2008; Storry, 2000).

As membranas celulares são formadas por uma bicamada fosfolipídica, entremeada por diversas outras moléculas, como glicolipídeos, colesterol e proteínas (Singer & Nicolson, 1972). Os lipídios estão associados entre si e às proteínas pelas forças atrativas de van-der-Waals. Essas ligações são fracas e permitem a movimentação das moléculas na membrana (Cooper, Arner, Wiley, & Shattil, 1975; Mohandas & Gallagher, 2008; Storry, 2000).

As proteínas que compõem a membrana são estruturalmente classificadas em integrais e periféricas. As proteínas integrais são aquelas que estão inseridas na bicamada lipídica, interagindo com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas; já as proteínas periféricas são as que se encontram na superfície interna e/ou externa da membrana (Storry, 2000).

As proteínas de membrana são essenciais para garantir o exercício das diferentes funções exercidas pelas membranas biológicas, como o transporte seletivo de substâncias entre o meio intracelular e extracelular (proteínas transportadoras) e a transdução de sinais externos para o interior da célula, dentre outras funções (van den Akker, Satchwell, Williamson, & Toye, 2010).

As proteínas presentes na membrana do eritrócito também possuem papel relevante na manutenção de sua integridade física, principalmente as que estão ligadas ao citoesqueleto, contribuindo para caracterizar a propriedade de membrana definida como estabilidade (Blanc et al., 2010; Mohandas & Evans, 1994).

A proteína banda-3 é a principal proteína integral da membrana, representando de 25 a 30% de todas as proteínas da membrana, sendo a responsável pelo transporte de ânions (van den Akker et al., 2010). Outras proteínas da membrana são aquaporina 1 (transportadora de água), o GLUT1 (transportador de glicose), o RHAG (transportador de gás, provavelmente de dióxido de carbono), e os co-transportadores Na^+Cl^- , Na^+K^+ , $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}^{\text{ase}}$, $\text{Ca}^{++}\text{ATP}^{\text{ase}}$ e $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$, dentre outras. A principal proteína com função adesiva é a ICAM-4 (Mohandas & Gallagher, 2008).

Outras proteínas integrais importantes são as proteínas transportadoras de íons e as glicoforinas A, B, C e D, as quais possuem receptores de membrana e de antígenos, além de

participar da estabilização do citoesqueleto e do reconhecimento celular estão associadas à especificidade dos grupos sanguíneos dos sistemas ABO e MN (Monhandas & Gallagher, 2008).

As proteínas periféricas estão concentradas, preferencialmente, na face citoplasmática da membrana, onde se ligam ao citoesqueleto e são constituídas, principalmente, por espectrina, actina, anquirina, banda 4.1 e banda 4.9. A espectrina é responsável pelo formato em disco bicôncavo do eritrócito (Naydenov & Ivanov, 2011).

Os principais lipídeos que compõem as membranas dos eritrócitos são fosfatidilcolina (25%), fosfatidiletanolamina (22%), fosfatidilserina (10%), esfingomielina (18%) e colesterol (25%). Há uma importante assimetria na composição fosfolipídica entre as duas lâminas da membrana. A fosfatidilcolina e esfingomielina estão predominantemente localizadas na camada externa, enquanto a fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (PS) e uma pequena quantidade de fosfoinositol estão confinadas na camada interna (Mohandas & Gallagher, 2008).

Os ácidos graxos polinsaturados presentes em fosfolipídeos de membrana são importantes na regulação da fluidez, deformabilidade e estabilidade da membrana. No entanto, essas moléculas podem ser alvo de peroxidação lipídica, gerando prejuízos à fluidez, deformabilidade e estabilidade da membrana, comprometendo a funcionalidade eritrocitária (Begum & Terao, 2002).

Teor de colesterol de membrana e níveis de colesterol plasmático

Uma vez que há *turnover* de colesterol entre a membrana e as lipoproteínas plasmáticas, a membrana do eritrócito sofre alterações em sua composição lipídica de acordo com os níveis de lipídios circulantes. Assim, uma desproporção na relação colesterol/fosfolipídios em lipoproteínas plasmáticas é capaz de gerar uma desproporção na razão colesterol/fosfolipídios na membrana dessa célula (Bernardino Neto et al., 2013; Cooper et al., 1975; da Silva Garrote-Filho, Bernardino-Neto, & Penha-Silva, 2017).

Na presença de excesso de LDL-C, uma parte do excesso deste colesterol é direcionada para a membrana do eritrócito. Até certo ponto, esta transferência de colesterol para a membrana do eritrócito é desejável e visa regular a fluidez de membrana dessa célula, de maneira a melhorar sua deformabilidade e estabilidade. Entretanto, quando essa transferência é excessiva, em função da existência de níveis excessivamente elevados de LDL-C na circulação sanguínea, esse processo contribui para diminuir a fluidez, a deformabilidade e a estabilidade do eritrócito, predispondo-o a sofrer lise (Bernardino Neto et al., 2013; Chabanel et al.,

1983; da Silva Garrote-Filho et al., 2017; Schick & Schick, 1985). É por isso que a redução da colesterolemia com tratamentos realizados com estatinas levam a redução no teor de colesterol de membrana do eritrócito, com diminuição da viscosidade sanguínea e melhora na microcirculação (Caliskan, Caliskan, Kuralay, & Onvural, 2000).

Assim, a fluidez, deformabilidade e estabilidade da membrana de eritrócitos dependem de um intervalo crítico de teor de colesterol abaixo e acima do qual estas células ficam com suas propriedades comprometidas (da Silva Garrote-Filho et al., 2017).

Propriedades da membrana eritrocitária

Fluidez, deformabilidade e estabilidade são importantes propriedades de membrana de eritrócitos e tem relação com a lipidemia, a lipoperoxidação e mesmo com a glicemia (Abad et al., 2010; Chabanel et al., 1983; Kung, Tseng, & Wang, 2009; Lemos, Marquez-Bernardes, Arvelos, Paraíso, & Penha-Silva, 2011). Mas qual a importância destas propriedades para o exercício das funções do eritrócito e que outros fatores estão associados a elas?

Para desempenhar bem suas funções, o eritrócito deve ser capaz de sofrer extensa deformação passiva, especialmente ao passar por capilares de pequeno diâmetro, sem sofrer lise. Quanto maior a deformabilidade menor é a tensão a ser aplicada para a passagem dos eritrócitos em capilares estreitos (Chasis & Mohandas, 1986).

A capacidade dinâmica das proteínas do citoesqueleto em se reorganizar diante de um estímulo mecânico é essencial para determinação de sua viscoelasticidade e deformabilidade, propriedades que dependem da forma/geometria do eritrócito e de sua viscosidade intracitoplasmática (Shiga, Maeda, & Kon, 1990).

A forma do eritrócito é influenciada pelo seu tamanho e pela relação superfície de área/volume (AS/V). A forma de disco bicôncavo assegura ao eritrócito o excesso de superfície de área (AS) que é necessário para permitir sua deformabilidade ao passar na microcirculação sem que ocorra lise. Por outro lado, se o eritrócito fosse esférico não conseguiria atingir a deformabilidade necessária, para passagem na microcirculação, sem perdas em seu volume ou superfície de área (Mohandas & Gallagher, 2008; Shiga et al., 1990) e, com isto, ele se fragmentaria facilmente.

A capacidade do eritrócito em alterar rapidamente o seu formato, especialmente em resposta à tensão de cisalhamento (*shear stress*) do fluxo sanguíneo, é também determinada pela viscosidade citoplasmática, a qual é regulada pela concentração de hemoglobina corpus-

cular média (MCHC) e volume de água intracelular. O controle rigoroso da viscosidade citoplasmática, em uma taxa estreita de variação aceitável, permite uma melhor acomodação dos eritrócitos na microcirculação sem que ocorra a sua lise ([Mohandas & Gallagher, 2008](#)).

Para se manter fisiologicamente ativa, a membrana do eritrócito deve apresentar um grau intermediário de fluidez, que se situa entre o estado sólido e líquido. A fluidez de membrana está relacionada à natureza e concentração de lipídeos em seu núcleo hidrofóbico. Uma maior quantidade de ácidos graxos polinsaturados nos fosfolipídios aumenta a fluidez da membrana, pois enfraquece as ligações intermoleculares de van der Waals. Ao contrário, uma quantidade maior de colesterol irá enrijecer a membrana, devido à maior proporção de anéis inflexíveis de colesterol ([Cooper et al., 1975](#)).

A capacidade da membrana em manter sua integridade fisicoquímica diante de situações adversas é denominada de estabilidade. Para tanto, a membrana biológica precisa resistir à fragmentação diante da agressão mecânica promovida pelo próprio fluxo sanguíneo e pelo atrito com a parede dos vasos (estabilidade mecânica), ou diante da expansão de volume em um meio hiposmótico (estabilidade osmótica), ou diante da presença de agentes químicos caotrópicos (estabilidade química) como a uréia e o etanol. Dessa forma, a estabilidade deve ser entendida com a máxima deformação que a membrana é capaz de sofrer antes que ocorra a sua lise. Entretanto, estabilidade e funcionalidade não são propriedades equivalentes, uma vez que uma maior estabilidade de membrana não coincide necessariamente com a melhor funcionalidade ([Abad et al., 2010](#)).

Na circulação sanguínea, o eritrócito precisa congrega da melhor forma possível propriedades que não são coincidentes, buscando conciliar a preservação de sua estrutura, a manutenção da viscosidade sanguínea com o transporte de gases e a manutenção da homeostase ácido-básica, dentre outras funções exercidas por esta célula. Mas isto nem sempre é possível, diante do grande conjunto de fatores que pode afetar desde a sua formação até a sua eliminação do organismo. Por isso, o estudo destas propriedades carece da utilização de métodos de estudo bem estruturados, na tentativa de entender as complexas relações existentes entre estas propriedades e todo o complexo conjunto de fatores que as determinam, especialmente em condições patológicas como a PE.

A estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos

O Laboratório de Biofísicoquímica (LaBFiQ) da Universidade Federal de Uberlândia padronizou métodos para estudo da estabilidade de membrana de eritrócitos na presença de solutos, como sorbitol, glicerol (C. C. Cunha, Arvelos, Costa, & Penha-Silva, 2007) etanol (Penha-Silva et al., 2008), detergentes (Fonseca et al., 2010) e sai (C. C. Cunha et al., 2007) e tem estudado este comportamento em indivíduos saudáveis (Bernardino Neto et al., 2013) e em diversas condições, tais como o envelhecimento (de Freitas et al., 2014; Penha-Silva et al., 2007) e doenças infecciosas (Mascarenhas Netto Rde et al., 2014).

A fragilidade osmótica *in vitro* é dependente da (1) tonicidade do meio de suspensão, do (2) pH; do (3) número total de constituintes osmóticos ativos, o que determina o volume celular em qualquer ambiente externo e do (4) volume hemolítico crítico, que é considerado um parâmetro complexo, pois é dependente da quantidade e qualidade de fatores associados aos lipídios de membrana e proteínas (Suhail, Patil, Khan, & Siddiqui, 2010).

À medida que aumenta a concentração de agente caotrópico ou diminui a tonicidade do meio, aumenta a lise dos eritrócitos. A curva de lise gerada através da diminuição de tonicidade do meio por decréscimo na concentração salina é dada por uma sigmoide decrescente. A regressão sigmoideal gerada pela liberação de hemoglobina possui um caráter semelhante aos sistemas cooperativos saturáveis. Ao analisar o perfil da lise eritrocitária a partir de diferentes gradientes de concentrações salinas, observamos que a liberação de hemoglobina parte de um platô mínimo estável (representado pela sigla $A_{\min}$, que se refere ao valor estacionário mínimo de absorvância), que reflete a menor taxa de hemoglobina liberada no meio e representa a hemólise ocorrida *in vivo*. À medida que a concentração salina no meio diminui, há um aumento gradativo da lise eritrocitária, que a partir de um determinado ponto sofre uma aceleração exponencial. Ao atingir o ponto intermediário da curva, a liberação de hemoglobina sofre uma desaceleração hiperbólica, até atingir um platô máximo estável (representado pela sigla $A_{\max}$), que se refere ao valor estacionário máximo de absorvância (Bernardino Neto et al., 2013; de Freitas et al., 2014).

A variação na concentração de sal (X) promove a transição entre os valores de $A_{\min}$ e $A_{\max}$, sendo que um quarto da diferença entre esses dois valores de concentração salina é representada pela variável dX . O ponto intermediário da concentração salina em que há uma taxa de 50% de lise dos eritrócitos presente no sistema é representado pela variável H_{50} (de Freitas et al., 2014).

A curva também define a variável H_0 , que representa a concentração salina necessária para iniciar a hemólise *in vitro* e é calculada pela fórmula $H_0 = H_{50} + 4dX/2$, bem como a variável H_{100} , que é a concentração salina necessária para promover a lise total das hemácias, calculada pela fórmula $H_{100} = H_{50} - 4dX/2$.

A variável dX , que representa $1/4$ da variação na concentração salina necessária para promover 100% de hemólise, é diretamente proporcional à estabilidade, uma vez que, quanto menor o valor de dX , menor é a estabilidade. Como a estabilidade de membrana é inversamente proporcional à fragilidade osmótica, neste caso há uma menor fragilidade osmótica dos eritrócitos quanto maior é o valor de dX .

Os parâmetros H_0 , H_{50} e H_{100} são proporcionais à fragilidade osmótica dos eritrócitos. Por isso, a utilização de suas formas inversas, $1/H_0$, $1/H_{50}$ e $1/H_{100}$ é que representa efetivamente a estabilidade osmótica daquelas células. dX é efetivamente uma variável de estabilidade osmótica de eritrócitos e, por isso, as razões dX/H_{50} e $dX/A_{\min}$, são diretamente proporcionais à estabilidade de membrana de eritrócitos, uma vez que $A_{\min}$ e H_{50} tem relações inversas com a estabilidade dessas células.

A cinética de lise mecânica de eritrócitos

Diante da importância de estudar e analisar a capacidade de deformabilidade das membranas dos eritrócitos, observando a resistência à lise em resposta à agressão mecânica, o grupo de pesquisa do LaBFiQ propôs a padronização de um método cinético para análise da lise mecânica de eritrócitos. A lise mecânica de eritrócitos foi promovida em equipamento desenvolvido pelo próprio grupo de trabalho, constituído por um rotor acoplado a uma hélice com velocidade controlada que opera em uma célula com 30 mL de capacidade, onde é colocada a suspensão de sangue a ser analisada após ser hermeticamente fechada (**Figura 1.4**).

A cinética de lise mecânica de eritrócitos pode ser convenientemente estudada com a utilização do formalismo matemático utilizado para estudo da cinética enzimática e representado pela chamada equação de Michaelis-Menten ([Menten & Michaelis, 1913](#)):

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (1.1),$$

que representa a dependência da velocidade inicial da reação (v_0) com a concentração do substrato (S), onde $V_{\max}$ é a velocidade máxima da reação e K_M é a concentração de substrato necessária para v_0 atingir a metade do valor da velocidade máxima (L. M. Cunha, 2017).

A cinética de Michaelis-Menten foi desenvolvida a partir de considerações fundamentadas no equilíbrio de estado estacionário de Briggs-Haldane (Briggs & Haldane, 1925):



que considera as reações de formação e dissociação do complexo enzima-substrato (ES), caracterizadas pelas suas respectivas constantes cinéticas k_{+1} e k_{-1} , e a reação de formação do produto (P), com regeneração da enzima livre (E), caracterizada pela constante cinética k_{+2} .

No curso da reação, a enzima é encontrada sob a forma livre (E) e a forma ligada ao substrato (ES). Em baixas concentrações de substrato, a maior quantidade de enzima está na forma livre. Sob estas condições, a velocidade inicial da reação (v_0) (Figura 1.5) aumenta quase linearmente com o aumento de S , uma vez que há enzima livre para promover aumento na velocidade da reação. À medida que ocorre maior aumento na concentração de S , mas a concentração total da enzima no meio permanece constante, o aumento em v_0 diminui, porque a população de enzima livre está em decréscimo. Quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na forma ligada (ES) e a concentração da enzima livre (E) for insignificante, a $V_{\max}$ é atingida. Nesta situação, a enzima está saturada pelo substrato, de forma que o aumento na concentração de S não é mais capaz de aumentar a velocidade da reação e o sistema está em equilíbrio de estado estacionário (Michaelis, Menten, Johnson, & Goody, 2011).

A cinética de Michaelis-Menten é um dos métodos utilizados para estudo da cinética de processos saturáveis em sistemas biológicos. Dessa forma, processos biológicos, como a cinética de lise de eritrócitos, que é ajustável por regressão não linear hiperbólica, pode ser analisada utilizando os princípios matemáticos do modelo cinético de Michaelis e Menten, com a utilização da equação:

$$A = \frac{A_{\max} t}{t_{1/2} + t} \quad (1.3),$$

onde $A_{\max}$, que é o máximo valor de absorbância atingido no platô da curva, representa a lise total dos eritrócitos, e $t_{1/2}$, que é o valor na abscissa do ponto intermediário da curva, representa o tempo requerido para ocorrência de metade da hemólise total ($A_{\max}/2$).

Estabilidade osmótica de eritrócitos na pré-eclâmpsia

A PE está associada à diminuição da estabilidade da membrana de eritrócitos. A redução da resistência osmótica da membrana de eritrócitos pode estar associada à disfunção na atividade de macrófagos descrita na PE (Lurie & Danon, 1992). Uma vez que os macrófagos são responsáveis pela fagocitose de eritrócitos senescentes, haveria um aumento na população de eritrócitos mais velhos os quais são menos estáveis quando comparados às formas jovens. (Lurie & Mamet, 2000).

Acredita-se, também, que a diminuição na estabilidade de eritrócitos na PE seja devido à interação de Mg^{++} e/ou K^+ com cargas de lipídios e de proteínas da membrana. O ambiente catiônico proporcionado pelo Mg^{++} , que é essencial para manter a atividade da $Na^+K^+-ATP^{ase}$ levaria a aumento na esfericidade e aumento da fragilidade osmótica da membrana de eritrócitos (Abad et al., 2010).

Fisiologia do fluxo sanguíneo

Os principais fatores que influenciam o fluxo sanguíneo são: função cardíaca (Aikimbaev et al., 2001), elasticidade da parede do vaso (complacência), tônus do músculo liso vascular e os diferentes padrões de ramificações e dimensões do vaso (Stein, 2009).

Embora os vasos sanguíneos tenham características diferentes das de um tubo rígido e o organismo tenha mecanismos dinâmicos de controle do fluxo sanguíneo, a Lei de Hagen-Poiseuille ajuda a entender alguns aspectos relevantes do fluxo de sangue por um vaso sanguíneo no organismo humano.

De acordo com a lei de Hagen-Poiseuille, a vazão ou velocidade do fluxo (Φ) de um volume de líquido em um tubo rígido é dada por:

$$\Phi = \frac{\pi R^4}{8\eta} \cdot \frac{|\Delta P|}{L} \quad (1.4),$$

onde R é o raio do tubo, η é a viscosidade do líquido, ΔP é a diferença de pressão entre os dois extremos de um tubo de comprimento fixo L (Cipolla, 2007; Hammer & Cipolla, 2015; Shiga et al., 1990).

A velocidade do fluxo depende do raio do vaso elevado à quarta potência. É por isso que diante de uma má perfusão tecidual ocorre vasodilatação (Cipolla, 2007), por exemplo.

A velocidade do fluxo é inversamente proporcional à viscosidade do sangue. Dessa forma, a composição do sangue e as variáveis e índices hematimétricos relacionados com volume, forma e teor de hemoglobina têm grande relação com as propriedades hemodinâmi-

cas do sangue, além de suas conhecidas relações com a fisiologia da circulação sanguínea (Aikimbaev et al., 2001; Shiga et al., 1990; Teixeira, Duncan, Letsky, & Fisk, 2000). Daí, inclusive, é que vem a associação das alterações patológicas nas propriedades de eritrócitos com alterações hemodinâmicas observadas no estudo de efeito Doppler do fluxo sanguíneo na artéria oftálmica de pacientes com PE (Stein, 2009) e as consequentes alterações na fisiologia do transporte de gases.

No interior de um vaso, o fluxo do sangue tende a ser laminar. Isto significa que próximo à parede do vaso, a velocidade do fluxo de sangue tende a zero, mas fica progressivamente maior no centro do vaso. Quando o fluxo sanguíneo torna-se turbulento, dá-se maior atrito dos eritrócitos com a parede do vaso e, conseqüentemente, ocorre aumento na dissipação de energia. Em vasos de menor calibre, a presença de fluxo turbulento gera um maior atrito, provocando uma maior resistência ao fluxo sanguíneo (Stein, 2009).

Efeito Doppler

O objetivo da ultrassonografia Doppler é compreender a dinâmica circulatória em determinado órgão, por meio da determinação da velocidade do fluxo sanguíneo no local (Lieb et al., 1991).

O sinal Doppler produzido por um equipamento é obtido por meio de mudanças de frequência do eco em alvos móveis (eritrócitos). As diferenças de frequências de desvios Doppler são extraídas a partir de um sinal complexo detectado e apresentado na forma de gráfico, em tela de vídeo. Essas representações gráficas são denominadas de onda de velocidade de pulso (PWV). O ponto máximo alcançado no espectro de uma OVP é denominado de pico de velocidade sistólico (PSV) e o ponto mínimo na morfologia da onda é a velocidade diastólica final (EDF) (Paes & Diniz, 2015; Williamson & Harris, 1996).

A impedância vascular é determinada por meio de índices que comparam o fluxo durante a sístole e a diástole. Os índices, por serem independentes do comprimento do vaso e do ângulo de insonação entre o aparelho e o vaso avaliado, são mais vantajosos no estudo de vasos tortuosos e de pequeno calibre (Diniz et al., 2008; Diniz, Moron, Santos, & Sass, 2004; Takata et al., 2002; Williamson & Harris, 1996).

Avaliação dopplervelocimétrica do território central

O Doppler transcraniano e o Doppler da artéria oftálmica (AO) têm se mostrado muito úteis na avaliação da hemodinâmica cerebrovascular em várias condições fisiológicas ou patológicas. No entanto, o Doppler transcraniano necessita de operador com experiência tanto na realização do exame quanto na interpretação dos resultados. Além disso, há uma barreira óssea dificultando a realização do exame e exigindo equipamento especial, que nem sempre está disponível na maioria dos centros de ecografia (Zétola et al., 2006).

A AO apresenta vantagens em relação aos demais vasos para o estudo dopplervelocimétrico de seu fluxo sanguíneo, uma vez que não há interposição de obstáculos - ossos e tecido adiposo - entre a AO e o feixe de ultrassom, e o seu trajeto é paralelo ao transdutor do aparelho; portanto, não há necessidade de se corrigir o ângulo de insonação entre eles (Lieb et al., 1991; Maruyoshi et al., 2010). Além disso, o equipamento é o mesmo utilizado na avaliação de órgãos superficiais. Por isso, a dopplervelocimetria da AO tem se mostrado como uma técnica mais promissora para análise vascular do território central, principalmente, em Obstetrícia, em que o uso de contrastes é proibido.

Anatomia da artéria oftálmica

A AO é o principal vaso da órbita (Figura 1.6). Ela é o primeiro ramo da artéria carótida interna e origina-se de sua porção cerebral em localização medial ao processo clinóide anterior. Na órbita, ela encontra-se localizada entre o músculo reto lateral e o nervo óptico, voltando-se, medialmente, entre o músculo reto superior e nervo óptico. Ela apresenta numerosas ramificações, as mais importantes são: artéria central da retina, ciliares posteriores e ciliar anterior. Diante de uma obstrução da carótida interna, a artéria oftálmica é capaz de promover a anastomose entre as artérias carótidas interna e externa seguindo a sequência dos seguintes vasos: artéria carótida externa, artéria temporal superficial, artéria supra-orbital, artéria oftálmica, artéria carótida interna (Diniz et al., 2004; Matias, Costa, Matias, Gordiano, & Correia, 2014).

Dopplervelocimetria da artéria oftálmica

Os achados dopplervelocimétricos da artéria oftálmica podem ser extrapolados para a circulação cerebrovascular. Isso ocorre porque a AO tem origem na artéria carótida interna, a qual é responsável por grande parte da circulação cerebral e, portanto, ela apresenta a mesma origem embriológica, anatômica dos vasos cerebrais (Carneiro et al., 2008; Diniz et al., 2008). Portanto, a dopplervelocimetria da artéria oftálmica é um método alternativo para estudo da hemodinâmica intra-craniana (Matias et al., 2014; Takata et al., 2002).

A **Figura 1.7** é uma representação esquemática da variação na velocidade do fluxo sanguíneo na AO em razão do tempo de duração de um ciclo cardíaco. A cada ejeção de sangue do ventrículo esquerdo (sístole), ocorre uma pressão de pulso que é representada por uma curva ascendente rápida, gerando o Pico de Velocidade Sistólica (PSV), o qual é seguido por queda repentina e uma elevação secundária de velocidade, gerando um segundo pico sistólico arredondado (P2) e uma incisura (incisura aórtica), antes do final do ciclo sistólico.

À medida que o diâmetro vascular retorna ao normal, a energia repercutida fornece um potencial necessário para promover fluxo contínuo durante a diástole, a qual é representada no gráfico por uma nova ascensão da velocidade, seguida por lenta desaceleração e terminando no pico de velocidade diastólica final (EDV) (Maruyoshi et al., 2010; Williamson & Harris, 1996).

A interpretação da representação gráfica do Doppler da AO ocorre pela análise 1) do formato da onda de velocidade de pulso (OVP), 2) dos picos de velocidades e 3) da velocidade média de um ciclo cardíaco (V_{mean}) e dos índices que relacionam as velocidades sistólica e diastólica: Índice de Pulsatilidade (PI), dado por $(PSV-EDV)/V_{mean}$; Índice de Resistência (RI), dado por $(PSV-EDV)/PSV$; e Peak Ratio (PR), dado por $P2/PSV$ (Diniz et al., 2008; Takata et al., 2002).

O serviço de ecografia do departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Uberlândia tem empregado a dopplervelocimetria da artéria oftálmica para o conhecimento da hemodinâmica cerebrovascular no ciclo gravídico-puerperal (Diniz, Moron, Santos, Sass, & Pires, 2005) e em suas intercorrências clínicas (Freitas, Diniz, Santos, Taliberit, & Ranza, 2009) e patológicas (Alves Borges, Goes, de Araujo, Dos Santos, & Debs Diniz, 2016; Anjos, Diniz, & Santos, 2012), inclusive aquelas, associadas ao abuso de tabaco (Paes & Diniz, 2015).

Dopplervelocimetria da artéria oftálmica na pré-eclâmpsia

O estudo da hemodinâmica cerebrovascular, durante a gestação, iniciou-se com as publicações de Hata et al (1995) que empregou a dopplervelocimetria da AO para conhecer o comportamento vascular cerebral em um grupo de pacientes com PE leve (Hata, Senoh, Hata, & Kitao, 1995). Desde então, a Dopplervelocimetria da AO vem sendo utilizada para o conhecimento de mudanças de velocidade de fluxo no território orbital e da resistência de vasos sanguíneos locais na gestação (Carneiro et al., 2008; C. A. de Oliveira et al., 2009; Laudanska-Olszewska & Omulecki, 2007) e em suas intercorrências clínicas. A dopplervelocimetria da AO apresentou maior destaque no estudo da pré-eclâmpsia. Vários autores observaram a presença de hiperperusão no território orbital de pacientes com pré-eclâmpsia (Aquino, Leite, Cabral, & Brandao, 2014; Ayaz et al., 2003; Barbosa et al., 2010).

Uma das hipóteses para explicar a vasodilatação em território orbital é a teoria hiperdinâmica proposta por Easterling et al. (1989) que descreve um aumento do débito cardíaco na pré-eclâmpsia acompanhado de vasodilatação sistêmica compensatória na tentativa de manter a pressão estável. Nesse modelo o débito cardíaco aumentado e a resistência periférica diminuída resultam em dano orgânico (Easterling & Benedetti, 1989). Isso é observado na encefalopatia reversível posterior, conhecida por PRES. Na presença de hiperfluxo cerebral, ocorre a perda da autorregulação da barreira hematoencefálica, com extravasamento de plasma e edema, preferencialmente, em território posterior do cérebro (Hammer & Cipolla, 2015).

Acredita-se, também, que o hiperfluxo cerebral seja decorrente da vasodilatação autorregulada de leitos vasculares fisiológicos (artéria carótida externa versus carótida interna) para manter uma adequada perfusão do sistema nervoso central e órbitas em situação de hipóxia (Silva Neto, 2015).

Outra hipótese é que um vasoespasma ocorreria na microcirculação, causando isquemia local. Em decorrência disso, ocorreria uma vasodilatação compensatória na AO, com maior calibre, para aumentar a perfusão no tecido isquemiado (Aikimbaev et al., 2001). Esse fenômeno foi denominado de centralização materna, em analogia ao que ocorre na circulação cerebral fetal em situação de hipóxia causada pela insuficiência placentária (Diniz et al., 2008).

Como o maior conhecimento da Dopplervelocimetria da AO foi descrito um novo parâmetro para esse vaso, o Peak Ratio, que mostrou-se mais sensível para avaliar as mudanças na velocidade de fluxo na circulação orbital (Takata et al., 2002). Diniz et al (2008) demonstrou que o uso do parâmetro do PR é capaz de discriminar os casos de pré-eclâmpsia leve e

grave e, também, demonstrou que nas pacientes com PE grave a OVP assumia o aspecto de corcova, em razão de aumento na amplitude e arredondamento de P2 (Diniz et al., 2008). Matias et al (2014) demonstraram que um valor de PR acima de 0.78 é capaz de diferenciar o casos de gestantes com PE em relação a gestantes normotensas (Matias et al., 2014).

Há poucos estudos sobre o uso dopplervelocimetria da AO na pré-eclâmpsia, quando essa é estratificada em EOPE e LOPE. Brandao et al não encontraram diferenças estatísticas significantes nos valores de RI obtidos por dopplervelocimetria da AO entre as pacientes com EOPE e LOPE (Brandao, Barbosa, Lopes, Leite, & Cabral, 2012). Para da Silva Netto et al (2009), os valores de PR da AO demonstraram diferenças significantes entre a EOPE e a LOPE (Silva Neto, 2015). Para Alves et al (2012) valores de P2 acima de 24,6 cm/s no primeiro trimestre de gestação foram associados a predição do risco de desenvolver pré-eclâmpsia de início precoce (Alves, Brennecke, & da Silva Costa, 2012).

Considerações Finais

Foi dentro deste contexto que a presente tese teve como objetivo estudar as diferenças antropométricas, hemodinâmicas, hematimétricas e bioquímicas existentes entre a pré-eclâmpsia de início precoce e a pré-eclâmpsia de início tardio, buscando encontrar e interpretar as associações existentes entre estes diferentes grupos de propriedades.

Referências

- Abad, C., Carrasco, M. J., Pinero, S., Delgado, E., Chiarello, D. I., Teppa-Garran, A., . . . Marin, R. (2010). Effect of magnesium sulfate on the osmotic fragility and lipid peroxidation of intact red blood cells from pregnant women with severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 29(1), 38-53. doi:10.3109/10641950902777713
- Abalos, E., Cuesta, C., Grosso, A. L., Chou, D., & Say, L. (2013). Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 170(1), 1-7. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.05.005
- AbdAlla, S., Lothar, H., el Massiery, A., & Quitterer, U. (2001). Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*, 7(9), 1003-1009. doi:10.1038/nm0901-1003
- Aikimbaev, K., Guvenc, B., Canataroglu, A., Canataroglu, H., Baslamisli, F., & Oguz, M. (2001). Value of duplex and color doppler ultrasonography in the evaluation of orbital vascular flow and resistance in sickle cell disease. *Am J Hematol*, 67(3), 163-167. doi:10.1002/ajh.1100
- Alves Borges, J. H., Goes, D. A., de Araujo, L. B., Dos Santos, M. C., & Debs Diniz, A. L. (2016). Prospective study of the hemodynamic behavior of ophthalmic arteries in postpartum preeclamptic women: A doppler evaluation. *Hypertens Pregnancy*, 35(1), 100-111. doi:10.3109/10641955.2015.1116553
- Alves, J. A., Brennecke, S. P., & da Silva Costa, F. (2012). OS088. First trimester triple vascular test for pre-eclampsia prediction. *Pregnancy Hypertens*, 2(3), 226. doi:10.1016/j.preghy.2012.04.089
- Amaral, L. M., Cunningham, M. W., Jr., Cornelius, D. C., & LaMarca, B. (2015). Preeclampsia: long-term consequences for vascular health. *Vasc Health Risk Manag*, 11, 403-415. doi:10.2147/vhrm.s64798
- Anjos, G. F. R., Diniz, A. L., & Santos, M. C. (2012). Study of ophthalmic artery hemodynamic pattern in pregnant women with gestacional diabetes mellitus. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 34, 473-477.
- Aquino, L. O., Leite, H. V., Cabral, A. C., & Brandao, A. H. (2014). Doppler flowmetry of ophthalmic arteries for prediction of pre-eclampsia. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 60(6), 538-541. doi:10.1590/1806-9282.60.06.011

- Ayaz, T., Akansel, G., Hayirlioglu, A., Arslan, A., Suer, N., & Kuru, I. (2003). Ophthalmic artery color Doppler ultrasonography in mild-to-moderate preeclampsia. *Eur J Radiol*, 46(3), 244-249.
- Bahado-Singh, R. O., Syngelaki, A., Akolekar, R., Mandal, R., Bjondahl, T. C., Han, B., . . . Nicolaides, K. H. (2015). Validation of metabolomic models for prediction of early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 213(4), 530.e531-530.e510. doi:10.1016/j.ajog.2015.06.044
- Barbosa, A. S., Pereira, A. K., Reis, Z. S., Lage, E. M., Leite, H. V., & Cabral, A. C. (2010). Ophthalmic artery-resistive index and evidence of overperfusion-related encephalopathy in severe preeclampsia. *Hypertension*, 55(1), 189-193. doi:10.1161/hypertensionaha.109.143586
- Baumfeld, Y., Novack, L., Wiznitzer, A., Sheiner, E., Henkin, Y., Sherf, M., & Novack, V. (2015). Pre-Conception Dyslipidemia Is Associated with Development of Preeclampsia and Gestational Diabetes Mellitus. *PLoS One*, 10(10), e0139164. doi:10.1371/journal.pone.0139164
- Begum, A. N., & Terao, J. (2002). Protective effect of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(2), 398-403. doi:10.1271/bbb.66.398
- Belfort, M. A., Giannina, G., & Herd, J. A. (1999). Transcranial and orbital Doppler ultrasound in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol*, 42(3), 479-506.
- Bell, M. J. (2010). A historical overview of preeclampsia-eclampsia. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 39(5), 510-518. doi:10.1111/j.1552-6909.2010.01172.x
- Bernardino Neto, M., de Avelar, E. B., Jr., Arantes, T. S., Jordao, I. A., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M., . . . Penha-Silva, N. (2013). Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology*, 50(5-6), 305-320. doi:10.3233/bir-130641
- Bernstein, I. M., Ziegler, W., & Badger, G. J. (2001). Plasma volume expansion in early pregnancy. *Obstet Gynecol*, 97(5 Pt 1), 669-672.
- Bille-Brahe, N. E., & Rorth, M. (1979). Red cell 2,3-diphosphoglycerate in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 58(1), 19-21.
- Blanc, L., Salomao, M., Guo, X., An, X., Gratzner, W., & Mohandas, N. (2010). Control of erythrocyte membrane-skeletal cohesion by the spectrin-membrane linkage. *Biochemistry*, 49(21), 4516-4523. doi:10.1021/bi1003684

- Bokslag, A., Teunissen, P. W., Franssen, C., van Kesteren, F., Kamp, O., Ganzevoort, W., . . . de Groot, C. J. (2017). Effect of early-onset preeclampsia on cardiovascular risk in the fifth decade of life. *Am J Obstet Gynecol*. doi:10.1016/j.ajog.2017.02.015
- Brandao, A. H. F., Barbosa, A. S., Lopes, A. P. B. M., Leite, H. V., & Cabral, A. C. V. (2012). Dopplerfluxometry of ophthalmic arteries and assessment of endotelial function in early and late preeclampsia. *Radiol. Bras.*, 45(1), 20-23. doi:10.1590/S0100-39842012000100006
- Briggs, G. E., & Haldane, J. B. S. (1925). *A note on the kinetics of enzyme action*. *Biochemical Journal*, 19 (2), 338.
- Brizzi, P., Tonolo, G., Esposito, F., Puddu, L., Dessole, S., Maioli, M., & Milia, S. (1999). Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 181(2), 430-434.
- Burrows, R. F., Hunter, D. J., Andrew, M., & Kelton, J. G. (1987). A prospective study investigating the mechanism of thrombocytopenia in preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 70(3 Pt 1), 334-338.
- Burton, G. J., Hempstock, J., & Jauniaux, E. (2001). Nutrition of the human fetus during the first trimester--a review. *Placenta*, 22 Suppl A, S70-77. doi:10.1053/plac.2001.0639
- Burton, G. J., Hempstock, J., & Jauniaux, E. (2003). Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online*, 6(1), 84-96.
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2004). Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*, 11(6), 342-352. doi:10.1016/j.jsigi.2004.03.003
- Caliskan, S., Caliskan, M., Kuralay, F., & Onvural, B. (2000). Effect of simvastatin therapy on blood and tissue ATP levels and erythrocyte membrane lipid composition. *Res Exp Med (Berl)*, 199(4), 189-194.
- Caniggia, I., Winter, J., Lye, S. J., & Post, M. (2000). Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*, 21 Suppl A, S25-30.
- Carneiro, R. S., Sass, N., Diniz, A. L., Souza, E. V., Torloni, M. R., & Moron, A. F. (2008). Ophthalmic artery Doppler velocimetry in healthy pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*, 100(3), 211-215. doi:10.1016/j.ijgo.2007.09.028
- Chabanel, A., Flamm, M., Sung, K. L., Lee, M. M., Schachter, D., & Chien, S. (1983). Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophys J*, 44(2), 171-176. doi:10.1016/s0006-3495(83)84288-x

- Charnock-Jones, D. S., & Burton, G. J. (2000). Placental vascular morphogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 14(6), 953-968. doi:10.1053/beog.2000.0137
- Chasis, J. A., & Mohandas, N. (1986). Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J Cell Biol*, 103(2), 343-350.
- Chen, M., Masaki, T., & Sawamura, T. (2002). LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*, 95(1), 89-100.
- Cipolla, M. J. (2007). Cerebrovascular function in pregnancy and eclampsia. *Hypertension*, 50(1), 14-24. doi:10.1161/hypertensionaha.106.079442
- Cipolla, M. J., & Biller, J. (2017). Persistent brain injury after preeclampsia. *Neurology*, 88(13), 1216-1217. doi:10.1212/wnl.0000000000003773
- Cipolla, M. J., Sweet, J. G., & Chan, S. L. (2011). Cerebral vascular adaptation to pregnancy and its role in the neurological complications of eclampsia. *J Appl Physiol* (1985), 110(2), 329-339. doi:10.1152/japplphysiol.01159.2010
- Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., . . . Sawamura, T. (2001). The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem*, 276(17), 13750-13755. doi:10.1074/jbc.M010612200
- Constantinescu, A., Han, D., & Packer, L. (1993). Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. *J Biol Chem*, 268(15), 10906-10913.
- Cooper, R. A., Arner, E. C., Wiley, J. S., & Shattil, S. J. (1975). Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *J Clin Invest*, 55(1), 115-126. doi:10.1172/jci107901
- Cunha, C. C., Arvelos, L. R., Costa, J. O., & Penha-Silva, N. (2007). Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr*, 39(4), 341-347. doi:10.1007/s10863-007-9092-z
- Cunha, L. M. (2017). Cinética de lise mecânica de eritrócitos humanos e sua associação com variáveis bioquímicas, hematológicas e oxidativas em indivíduos saudáveis e indivíduos com diabetes mellitus tipo1. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia Uberlândia, MG, Brasil.

- da Silva Garrote-Filho, M., Bernardino-Neto, M., & Penha-Silva, N. (2017). Influence of Erythrocyte Membrane Stability in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 19(4), 17. doi:10.1007/s11883-017-0653-2
- de Freitas, M. V., Marquez-Bernardes, L. F., de Arvelos, L. R., Paraiso, L. F., Goncalves, E. O. A. F., Mascarenhas Netto Rde, C., . . . Penha-Silva, N. (2014). Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*, 19(7), 424-430. doi:10.1179/1607845413y.0000000145
- de Oliveira, C. A., de Sa, R. A., Velarde, L. G., Marchiori, E., Netto, H. C., & Ville, Y. (2009). Doppler velocimetry of the ophthalmic artery in normal pregnancy: reference values. *J Ultrasound Med*, 28(5), 563-569.
- de Oliveira, L. G., Karumanchi, A., & Sass, N. (2010). [Preeclampsia: oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 32(12), 609-616.
- Diniz, A. L., Moron, A. F., dos Santos, M. C., Sass, N., Pires, C. R., & Debs, C. L. (2008). Ophthalmic artery Doppler as a measure of severe pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*, 100(3), 216-220. doi:10.1016/j.ijgo.2007.07.013
- Diniz, A. L., Moron, A. F., Santos, M. C., & Sass, N. (2004). Color Dopplervelocimetry of orbital vessels: technique and normal vascular anatomy. *Radiol. Bras.*, 37(4), 287-290. doi:10.1590/S0100-39842004000400013
- Diniz, A. L., Moron, A. F., Santos, M. C., Sass, N., & Pires, C. R. (2005). Dopplervelocimetria das artérias oftálmica e central da retina em gestantes normais. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 27(4), 168-173.
- Dordevic, N. Z., Babic, G. M., Markovic, S. D., Ognjanovic, B. I., Stajn, A. S., Zikic, R. V., & Saicic, Z. S. (2008). Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclampsia in women. *Reprod Toxicol*, 25(2), 213-218. doi:10.1016/j.reprotox.2007.11.001
- Duckitt, K., & Harrington, D. (2005). Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *Bmj*, 330(7491), 565. doi:10.1136/bmj.38380.674340.E0
- Duley, L. (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*, 33(3), 130-137. doi:10.1053/j.semperi.2009.02.010
- Easterling, T. R., & Benedetti, T. J. (1989). Preeclampsia: a hyperdynamic disease model. *Am J Obstet Gynecol*, 160(6), 1447-1453.

- Fonseca, L. C., Arvelos, L. R., Netto, R. C., Lins, A. B., Garrote-Filho, M. S., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. *J Bioenerg Biomembr*, 42(5), 413-418. doi:10.1007/s10863-010-9310-y
- Freitas, M. A. R., Diniz, A. L., Santos, M. A., Taliberit, B. H., & Ranza, R. (2009). Orbital territory hyperperfusion in pregnant women with systemic lupus erythematosus. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 31(11), 534-539. doi:10.1590/S0100-72032009001100002
- Giordano, J. C., Parpinelli, M. A., Cecatti, J. G., Haddad, S. M., Costa, M. L., Surita, F. G., . . . Sousa, M. H. (2014). The burden of eclampsia: results from a multicenter study on surveillance of severe maternal morbidity in Brazil. *PLoS One*, 9(5), e97401. doi:10.1371/journal.pone.0097401
- Hammer, E. S., & Cipolla, M. J. (2015). Cerebrovascular Dysfunction in Preeclamptic Pregnancies. *Curr Hypertens Rep*, 17(8), 64. doi:10.1007/s11906-015-0575-8
- Hata, T., Senoh, D., Hata, K., & Kitao, M. (1995). Ophthalmic artery velocimetry in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*, 40(1), 32-35.
- Heilmann, L., Rath, W., & Pollow, K. (2004). Hemorheological changes in women with severe preeclampsia. *Clin Hemorheol Microcirc*, 31(1), 49-58.
- Hernandez Hernandez, J. D., Villasenor, O. R., Del Rio Alvarado, J., Lucach, R. O., Zarate, A., Saucedo, R., & Hernandez-Valencia, M. (2015). Morphological changes of red blood cells in peripheral blood smear of patients with pregnancy-related hypertensive disorders. *Arch Med Res*, 46(6), 479-483. doi:10.1016/j.arcmed.2015.07.003
- Herrera, E. (2000). Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr*, 54 Suppl 1, S47-51.
- Hubel, C. A., Lyall, F., Weissfeld, L., Gandley, R. E., & Roberts, J. M. (1998). Small low-density lipoproteins and vascular cell adhesion molecule-1 are increased in association with hyperlipidemia in preeclampsia. *Metabolism*, 47(10), 1281-1288.
- Huppertz, B. (2008). Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*, 51(4), 970-975. doi:10.1161/hypertensionaha.107.107607
- Hustin, J., & Schaaps, J. P. (1987). Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 157(1), 162-168.

- Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. (2013). *Obstet Gynecol*, 122(5), 1122-1131. doi:10.1097/01.aog.0000437382.03963.88
- Jarvie, E., Hauguel-de-Mouzon, S., Nelson, S. M., Sattar, N., Catalano, P. M., & Freeman, D. J. (2010). Lipotony in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clin Sci (Lond)*, 119(3), 123-129. doi:10.1042/cs20090640
- Kahhale, S., & Zugaib, M. (2013). O endotélio e o óxido nítrico na pré-eclâmpsia. In Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia; Urbanetz AA., Luz SH, organizadores. PROAGO Programa de Atualização em Ginecologia e Obstetrícia: Ciclo 11. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2013. p83-103. (Sistema de Educação a Distância,v3.
- Kaufmann, P., Black, S., & Huppertz, B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*, 69(1), 1-7. doi:10.1095/biolreprod.102.014977
- Kung, C. M., Tseng, Z. L., & Wang, H. L. (2009). Erythrocyte fragility increases with level of glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients. *Clin Hemorheol Microcirc*, 43(4), 345-351. doi:10.3233/ch-2009-1245
- Laudanska-Olszewska, I., & Omulecki, W. (2007). [Estimation of Doppler qualitative blood flow parameters in the eyeball arteries in early pregnancy]. *Klin Oczna*, 109(7-9), 304-307.
- Lemos, G. S., Marquez-Bernardes, L. F., Arvelos, L. R., Paraiso, L. F., & Penha-Silva, N. (2011). Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. *Cell Biochem Biophys*, 61(3), 531-537. doi:10.1007/s12013-011-9235-z
- Lieb, W. E., Cohen, S. M., Merton, D. A., Shields, J. A., Mitchell, D. G., & Goldberg, B. B. (1991). Color Doppler imaging of the eye and orbit. Technique and normal vascular anatomy. *Arch Ophthalmol*, 109(4), 527-531.
- Lippi, G., Albiero, A., Montagnana, M., Salvagno, G. L., Scevarolli, S., Franchi, M., & Guidi, G. C. (2007). Lipid and lipoprotein profile in physiological pregnancy. *Clin Lab*, 53(3-4), 173-177.
- Lisonkova, S., & Joseph, K. S. (2013). Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *Am J Obstet Gynecol*, 209(6), 544.e541-544.e512. doi:10.1016/j.ajog.2013.08.019

- Lisonkova, S., Sabr, Y., Mayer, C., Young, C., Skoll, A., & Joseph, K. S. (2014). Maternal morbidity associated with early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 124(4), 771-781. doi:10.1097/aog.0000000000000472
- Lorquet, S., Pequeux, C., Munaut, C., & Foidart, J. M. (2010). Aetiology and physiopathology of preeclampsia and related forms. *Acta Clin Belg*, 65(4), 237-241. doi:10.1179/acb.2010.051
- Lurie, S., & Danon, D. (1992). Life span of erythrocytes in late pregnancy. *Obstet Gynecol*, 80(1), 123-126.
- Lurie, S., & Mamet, Y. (2000). Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 93(2), 185-192.
- Margarson, M. P., & Soni, N. (1998). Serum albumin: touchstone or totem? *Anaesthesia*, 53(8), 789-803.
- Marra, A., Vargas, M., Striano, P., Del Guercio, L., Buonanno, P., & Servillo, G. (2014). Posterior reversible encephalopathy syndrome: the endothelial hypotheses. *Med Hypotheses*, 82(5), 619-622. doi:10.1016/j.mehy.2014.02.022
- Maruyoshi, H., Kojima, S., Kojima, S., Nagayoshi, Y., Horibata, Y., Kaikita, K., . . . Ogawa, H. (2010). Waveform of ophthalmic artery Doppler flow predicts the severity of systemic atherosclerosis. *Circ J*, 74(6), 1251-1256.
- Mascarenhas Netto Rde, C., Fabbri, C., de Freitas, M. V., Bernardino Neto, M., Garrote-Filho, M. S., Lacerda, M. V., . . . Penha-Silva, N. (2014). Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res*, 113(3), 863-874. doi:10.1007/s00436-013-3717-4
- Matias, D. S., Costa, R. F., Matias, B. S., Gordiano, L., & Correia, L. C. (2014). Predictive value of ophthalmic artery Doppler velocimetry in relation to development of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 44(4), 419-426. doi:10.1002/uog.13313
- Menten, L., & Michaelis, M. (1913). *Die kinetik der invertinwirkung*. *Biochem Z*, 49, 333-369.
- Michaelis, L., Menten, M. L., Johnson, K. A., & Goody, R. S. (2011). The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264-8269. doi:10.1021/bi201284u
- Milman, N., Graudal, N., Nielsen, O. J., & Agger, A. O. (1997). Serum erythropoietin during normal pregnancy: relationship to hemoglobin and iron status markers and impact of

- iron supplementation in a longitudinal, placebo-controlled study on 118 women. *Int J Hematol*, 66(2), 159-168.
- Mohandas, N., & Evans, E. (1994). Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23, 787-818. doi:10.1146/annurev.bb.23.060194.004035
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948. doi:10.1182/blood-2008-07-161166
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2012). *Embiologia Clínica* (Adriana Paulino do Nascimento... et al, Trad). Rio de Janeiro: Edições 9,Elsevier. (Obra original publicada em 2012).
- Moran, P., Lindheimer, M. D., & Davison, J. M. (2004). The renal response to preeclampsia. *Semin Nephrol*, 24(6), 588-595.
- Naydenov, N. G., & Ivanov, A. I. (2011). Spectrin-adducin membrane skeleton: A missing link between epithelial junctions and the actin cytoskeleton? *Bioarchitecture*, 1(4), 186-191. doi:10.4161/bioa.1.4.17642
- Paes, M. M., & Diniz, A. L. (2015). Chronic perfusion changes and reduction in preeclampsia incidence in pregnant smokers: an ophthalmic artery Doppler study. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 28(17), 2074-2079. doi:10.3109/14767058.2014.978756
- Penha-Silva, N., Arvelos, L. R., Cunha, C. C., Aversi-Ferreira, T. A., Gouvea-e-Silva, L. F., Garrote-Filho, M. S., . . . de Freitas Reis, F. G. (2008). Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry*, 73(1), 23-29. doi:10.1016/j.bioelechem.2008.04.002
- Penha-Silva, N., Firmino, C. B., de Freitas Reis, F. G., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M., de Freitas, M. V., & Netto, R. C. (2007). Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev*, 128(7-8), 444-449. doi:10.1016/j.mad.2007.06.007
- Reis, Z. S., Lage, E. M., Teixeira, P. G., Porto, L. B., Guedes, L. R., Oliveira, E. C., & Cabral, A. C. (2010). [Early-onset preeclampsia: is it a better classification for maternal and perinatal outcomes?]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 32(12), 584-590.
- Robson, S. C., Hunter, S., Boys, R. J., & Dunlop, W. (1989). Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am J Physiol*, 256(4 Pt 2), H1060-1065.
- Sankaralingam, S., Xu, Y., Sawamura, T., & Davidge, S. T. (2009). Increased lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 expression in the maternal vasculature of

- women with preeclampsia: role for peroxynitrite. *Hypertension*, 53(2), 270-277. doi:10.1161/hypertensionaha.108.122630
- Say, L., Chou, D., Gemmill, A., Tuncalp, O., Moller, A. B., Daniels, J., . . . Alkema, L. (2014). Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*, 2(6), e323-333. doi:10.1016/s2214-109x(14)70227-x
- Schick, B. P., & Schick, P. K. (1985). Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. *Biochim Biophys Acta*, 833(2), 281-290.
- Schreurs, M. P., Hubel, C. A., Bernstein, I. M., Jeyabalan, A., & Cipolla, M. J. (2013). Increased oxidized low-density lipoprotein causes blood-brain barrier disruption in early-onset preeclampsia through LOX-1. *Faseb j*, 27(3), 1254-1263. doi:10.1096/fj.12-222216
- Shiga, T., Maeda, N., & Kon, K. (1990). Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hematol*, 10(1), 9-48.
- Siepmann, T., Boardman, H., Bilderbeck, A., Griffanti, L., Kenworthy, Y., Zwager, C., . . . Leeson, P. (2017). Long-term cerebral white and gray matter changes after preeclampsia. *Neurology*, 88(13), 1256-1264. doi:10.1212/wnl.0000000000003765
- Silva Filho, A. L. (2017). *Manual SOGIMIG de ginecologia e obstetrícia*. Rio de Janeiro.
- Silva Neto, J. P. (2015). Dopplervelocimetria da artéria oftálmica nas formas precoce e tardia da pré-eclâmpsia. Tese. Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil. .
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.
- Spickett, C. M., Reglinski, J., Smith, W. E., Wilson, R., Walker, J. J., & McKillop, J. (1998). Erythrocyte glutathione balance and membrane stability during preeclampsia. *Free Radic Biol Med*, 24(6), 1049-1055.
- Stein, N. R. (2009). Elevação da razão entre os picos de velocidade no estudo Doppler da artéria oftálmica de pacientes com pré-eclâmpsia. Tese Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Stone, J. H. (1998). HELLP syndrome: hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets. *Jama*, 280(6), 559-562.
- Storry, J. R. (2000). A review: modification of the red blood cell membrane and its application in blood group serology. *Immunohematology*, 16(3), 101-104.
- Suhail, M., Patil, S., Khan, S., & Siddiqui, S. (2010). Antioxidant Vitamins and Lipoperoxidation in Non-pregnant, Pregnant, and Gestational Diabetic Women:

- Erythrocytes Osmotic Fragility Profiles. *J Clin Med Res*, 2(6), 266-273. doi:10.4021/jocmr454w
- Takata, M., Nakatsuka, M., & Kudo, T. (2002). Differential blood flow in uterine, ophthalmic, and brachial arteries of preeclamptic women. *Obstet Gynecol*, 100(5 Pt 1), 931-939.
- Teixeira, J. M., Duncan, K., Letsky, E., & Fisk, N. M. (2000). Middle cerebral artery peak systolic velocity in the prediction of fetal anemia. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 15(3), 205-208. doi:10.1046/j.1469-0705.2000.00070.x
- Valensise, H., Vasapollo, B., Gagliardi, G., & Novelli, G. P. (2008). Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension*, 52(5), 873-880. doi:10.1161/hypertensionaha.108.117358
- van den Akker, E., Satchwell, T. J., Williamson, R. C., & Toye, A. M. (2010). Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells Mol Dis*, 45(1), 1-8. doi:10.1016/j.bcmd.2010.02.019
- von Dadelszen, P., Magee, L. A., & Roberts, J. M. (2003). Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 22(2), 143-148. doi:10.1081/prg-120021060
- Weiner, C. P., & Thompson, L. P. (1997). Nitric oxide and pregnancy. *Semin Perinatol*, 21(5), 367-380.
- Williamson, T. H., & Harris, A. (1996). Color Doppler ultrasound imaging of the eye and orbit. *Surv Ophthalmol*, 40(4), 255-267.
- Yucel, B., & Ustun, B. (2017). Neutrophil to lymphocyte ratio, platelet to lymphocyte ratio, mean platelet volume, red cell distribution width and plateletcrit in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 7, 29-32. doi:10.1016/j.preghy.2016.12.002
- Zétola, V. F., Lange, M. C., Muzzio, J. A., Marchioro, I., Novak, E. M., & Werneck, L. C. (2006). Doppler transcraniano na prática neurológica. *Arq Neuropsiquiatr*, 64(1), 100-103.
- Zugaib, M. (2008). *Zugaib Obstetricia* (1ª ed.). São Paulo: Manole.

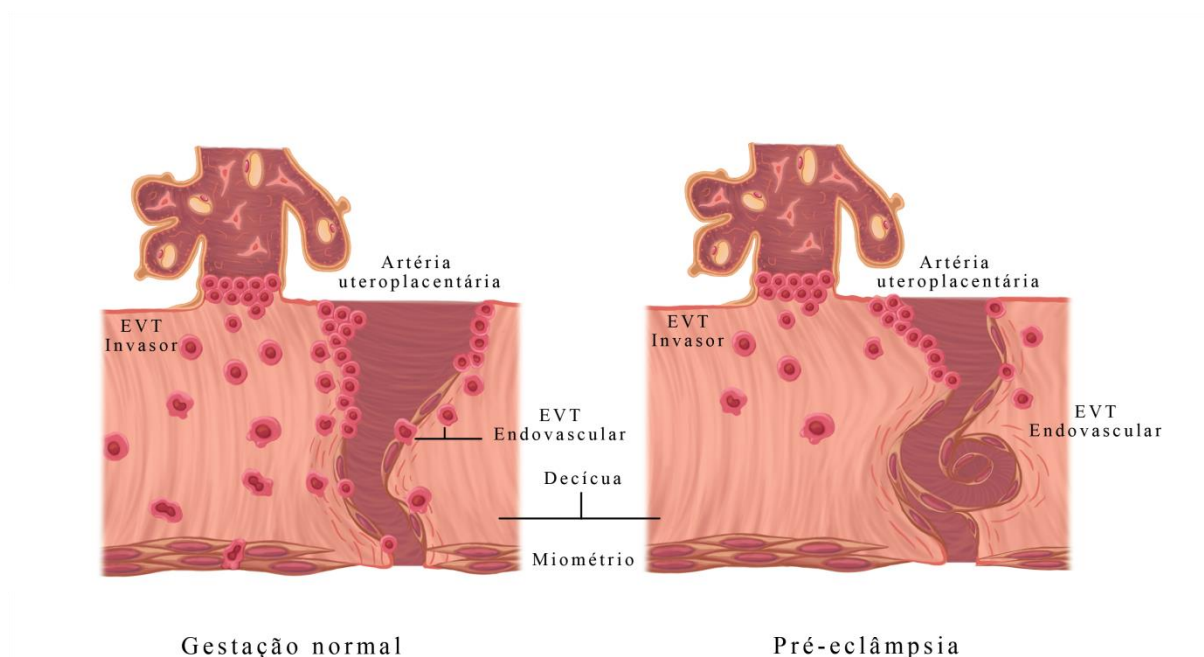


Figura 1.1. Representação esquemática da invasão do trofoblasto endovascular nas artérias espiraladas após a 12^a semana de gestação normal e de gestação com pré-eclâmpsia. O EVT (trofoblasto endovenoso) adquire o fenótipo invasivo, transformando-se em EVT invasivo, rompe a membrana basal, invade a decídua basal do endométrio e penetra na parede das artérias espiraladas (EVT endovascular), promovendo a substituição tanto da camada muscular quanto do endotélio por células trofoblásticas. Consequentemente, formam-se artérias uteroplacentárias largas, constituindo um ambiente de baixa resistência vascular capaz de promover trocas de gases e nutrientes com maior eficiência. Na pré-eclâmpsia, há diferenciação incompleta do EVT em seu fenótipo invasivo endovascular e, assim, as artérias espiraladas não são invadidas em sua totalidade e, portanto, não se formam as artérias uteroplacentárias largas e de baixa resistência, gerando um ambiente de hipóxia. Adaptado da literatura (Kaufmann et al., 2003).

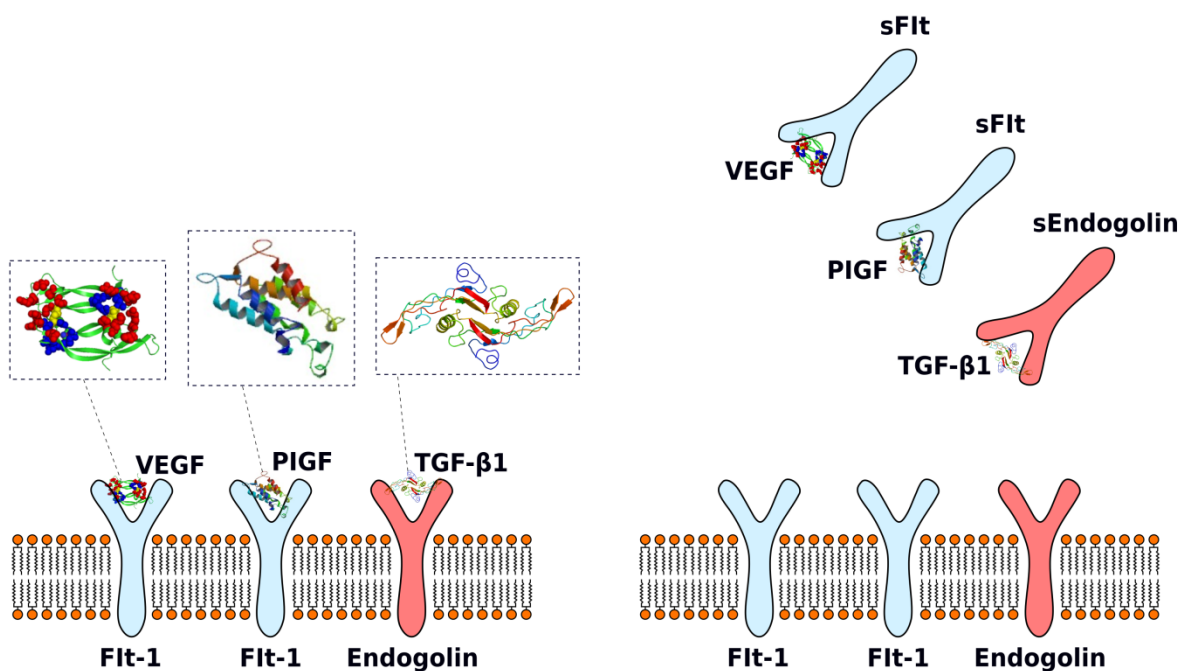


Figura 1.2. No primeiro esquema observa-se a ligação normal entre os fatores angiogênicos VEGF (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), PlGF (do inglês *Placental Growth Fator*) ao receptor Flt-1 (do inglês *Fms-like Tyrosin*) e TGF-β1 (do inglês *Transforming Grouwth Factor β1*) ao receptor Endogolin na membrana célula. Em seguida, há interceptação dos fatores antiangiogênicos pelo sFlt (do inglês *soluble Fms-like tyrosin*) e sEndogolin (do inglês, *soluble endogolin*) impedindo a homeostase celular endotelial. Adaptado da literatura (L. G. de Oliveira et al., 2010).

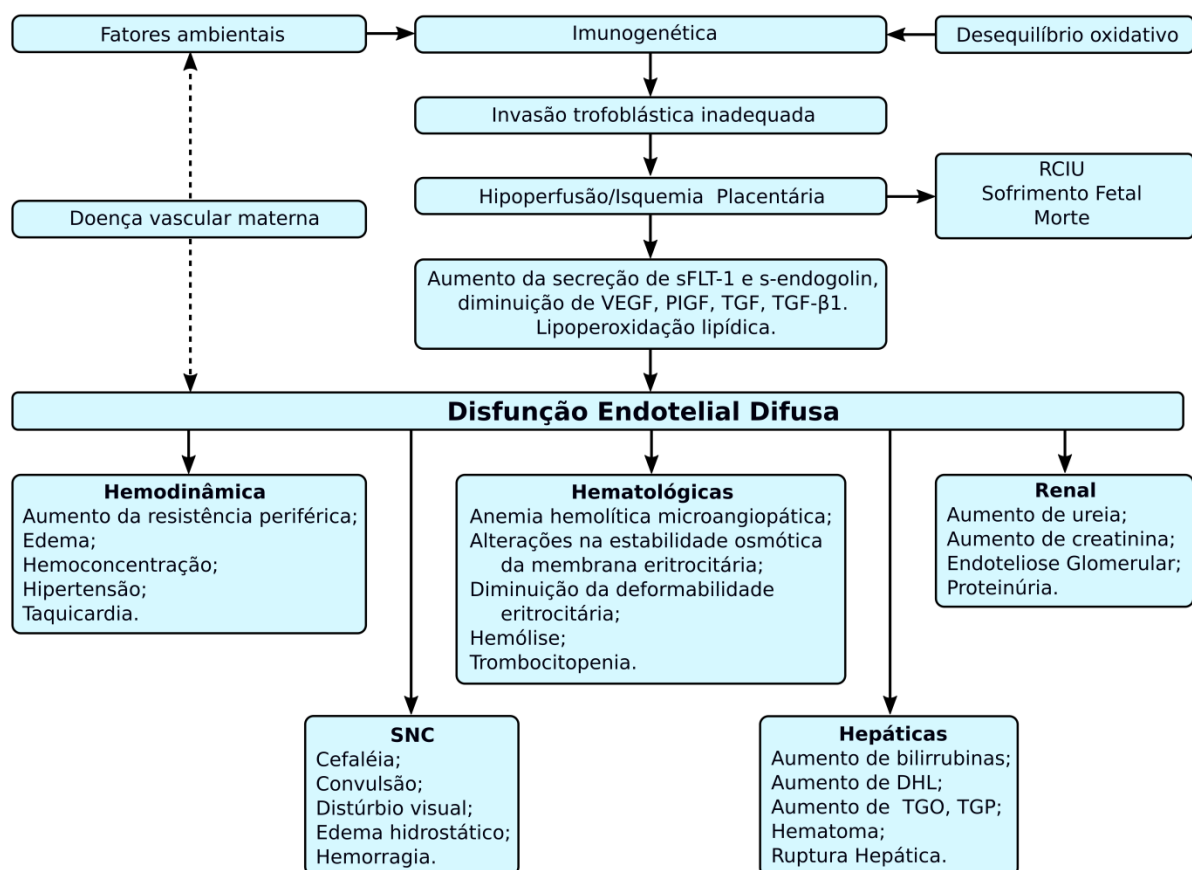


Figura 1.3. Principais alterações fisiopatológicas da pré-eclâmpsia. Adaptado da literatura (Zugaib, 2008).

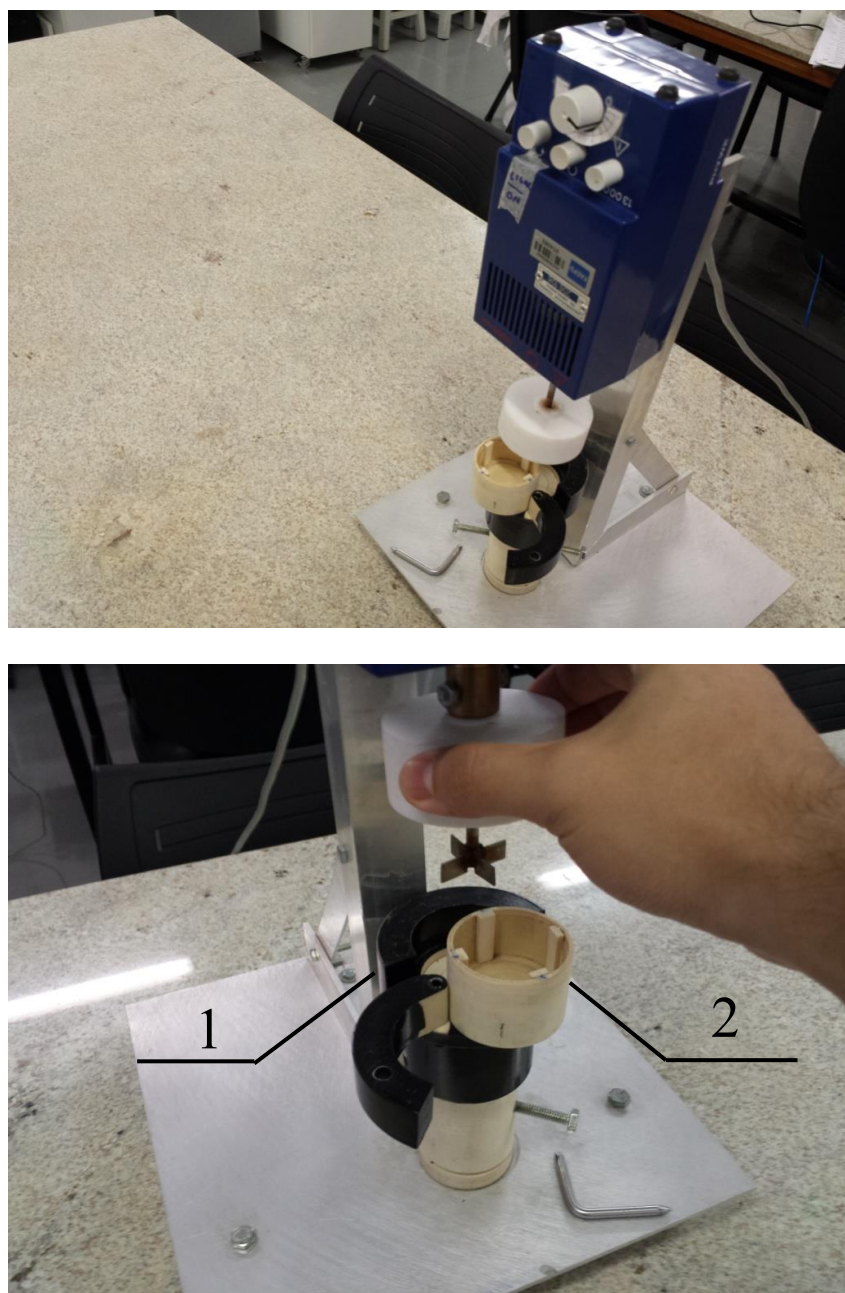


Figura 1.4. Imagens do aparelho desenvolvido para análise de lise mecânica de eritrócitos por estresse mecânico desenvolvido pelo Instituto de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia: A- imagem do rotor; B- (1) conjunto de pás acopladas ao rotor e (2) célula onde é colocada a suspensão de eritrócitos. Fonte: [Cunha, L.M. et al, 2017](#).

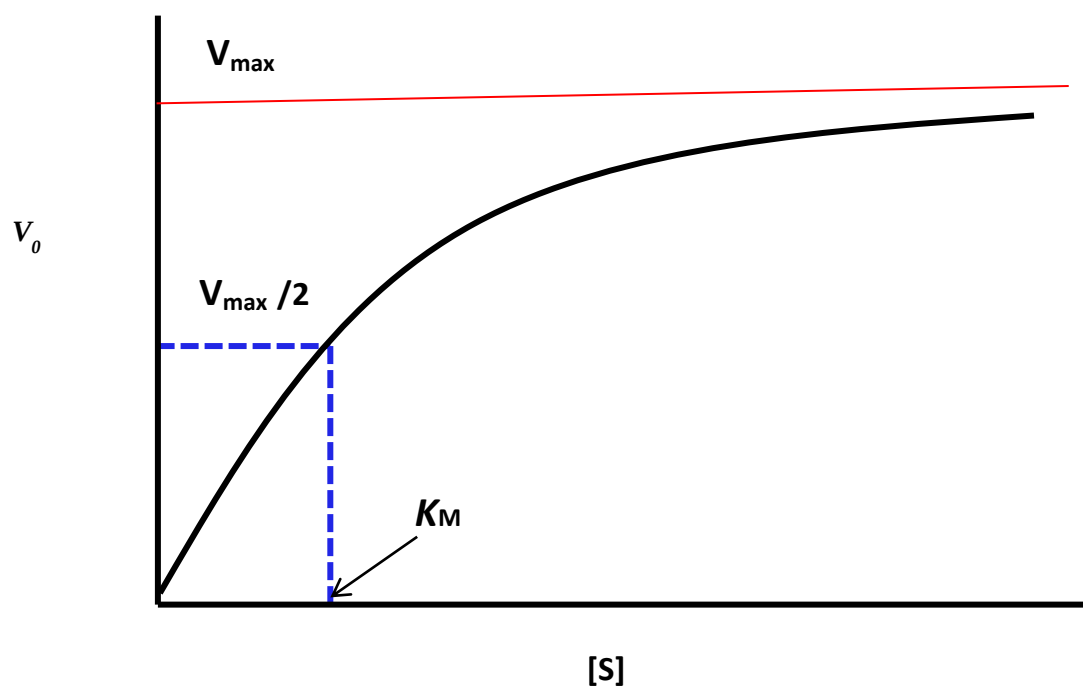
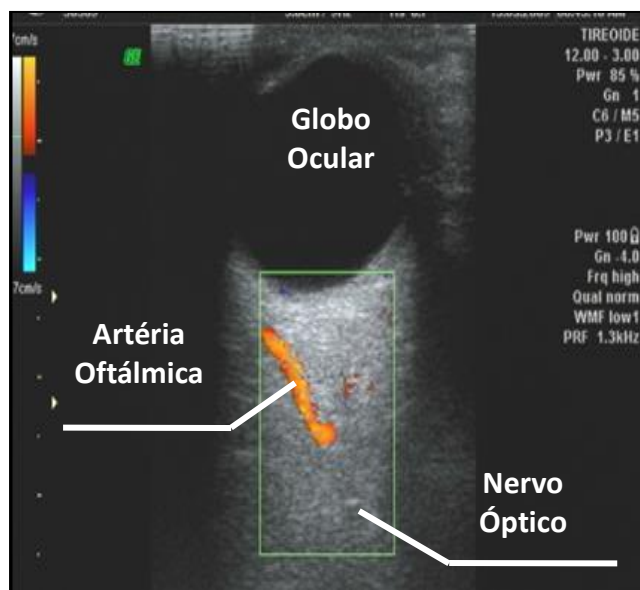
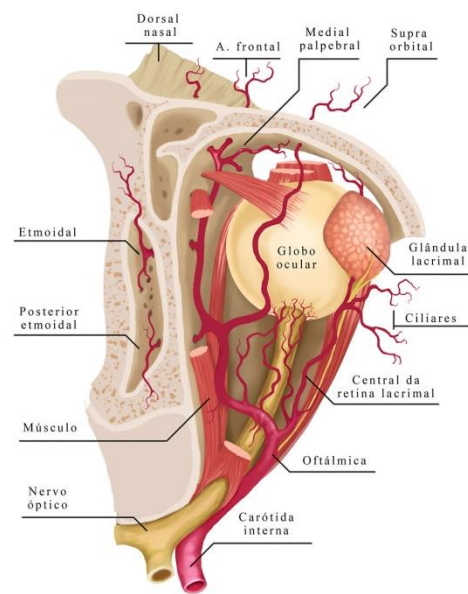


Figura 1.5. Gráfico ilustrativo do efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação enzimática, com representação das constantes cinéticas de Michaelis-Menten ($V_{\max}$ e K_M).



A



B

Figura 1.6 A) Imagem ultrassonográfica da órbita e estruturas retro-orbitárias, com superposição de *color Doppler* para identificação da artéria oftálmica (AO). Fonte: Diniz, A. L. et al., 2008. **B)** Representação esquemática da anatomia da artéria oftálmica e de suas ramificações. Fonte: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray514.png> (adaptado).

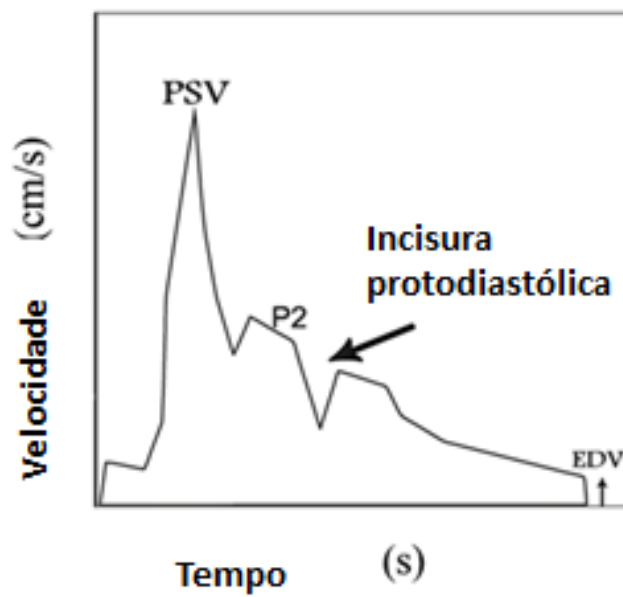


Figura 1.7. Representação esquemática da variação na velocidade do fluxo sanguíneo na AO em razão do tempo de duração de um ciclo cardíaco. PSV, Pico de Velocidade Sistólica; P₂, segundo pico de velocidade sistólica; EDV, velocidade diastólica final. Adaptada de [Willian-son & Harris,1996](#).

Tabela 1.1 Fatores de risco para pré-eclâmpsia

Fatores de Risco	Risco Relativo (RR), 95% do Intervalo de Confiança (IC)
Presença de anticorpo antifosfolipídio	RR 9.72, 95% IC 4.34-21.75
História prévia de pré-eclâmpsia	RR 7.90, 95% IC 5.85-8.83
Diabetes pré-gestacional	RR 3.96, 95% IC 2.54-4.99
Gravidez gemelar	RR 2.93, 95% IC 2.04-4.21
Primigesta	RR 2.91, 95% IC 1.28-6.61
História familiar de pré-eclâmpsia	RR 2.90, 95% IC 1.70-4.93
Índice de Massa Corporal $\geq 26 \text{ kg/m}^2$	RR 2.47, 95% IC 1.66-3.67
Idade acima de 40 anos	RR 1.96, 95% IC 1.34-2.87
Níveis pressóricos $\geq 130/80 \text{ mmHg}$	RR 1.38 (se PAD $\geq 110 \text{ mmHg}$ RR 5.2)

Fonte: Duckitt, K., & Harrington, D. (2005). Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*, 330(7491), 565. doi:10.1136/bmj.38380.674340.E0.

Tabela 1.2 Critérios diagnósticos de pré-eclâmpsia

Critérios
Pressão Arterial Sistólica ≥ 140 mmHg ou Pressão Arterial Diastólica ≥ 90 mmHg, observadas, em duas ocasiões com intervalo de 4 horas, após a 20ª semana de gestação em pacientes previamente normotensas. Se Pressão Arterial Sistólica ≥ 160 mmHg ou Pressão Arterial Diastólica ≥ 110 mmHg, observadas em duas ocasiões com intervalo de minutos, após a 20ª semana de gestação em pacientes previamente normotensas.
e
Proteinúria (a excreção de proteínas $\geq 0,3$ g/dL em urina de 24 horas, sem evidências de infecção ou relação proteína/creatinina ≥ 3 mg/mg). 1+ ou mais em fita reagente de urina, sem evidências de infecção.
ou
Plaquetas < 100.000 células/mm ³ . Creatinina sérica > 1.1 mg/dL. Aumento de Transaminases Hepáticas duas vezes o valor de normalidade do laboratório. Edema Pulmonar. Sintomas de comprometimento visual ou cerebral (cefaleia persistente, visão turva, escotomas cintilantes).
Fonte: American College of Obstetricians and Gynecologists ("Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy," 2013).

Capítulo 2

Are there differences in the anthropometric, hemodynamic, hematologic and biochemical profiles between late- and early-onset preeclampsia?

Márcia Aires Rodrigues de Freitas^{1,2}, Alice Vieira da Costa², Luciana Alves de Medeiros², Mario da Silva Garrote Filho², Angélica Lemos Debs Diniz¹, Nilson Penha-Silva²

¹Faculty of Medicine and ²Institute of Genetics and Biochemistry of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

Resumo

[Existem diferenças nos perfis antropométricos, hemodinâmicos, hematológicos e bioquímicos entre pré-eclâmpsia de início tardio e de início precoce?]

A pré-eclâmpsia (PE) é classificada em de início (EOPE) e tardio (LOPE) quando presente antes ou após 34 semanas de gestação, respectivamente. Este estudo transversal investigou as diferenças e possíveis associações existentes entre os perfis antropométricos, hemodinâmicos, hematológicos e bioquímicos na pré-eclâmpsia entre os grupos EOPE e LOPE. O estudo incluiu 65 voluntárias admitidas em um hospital universitário no Brasil sendo 29 normotensos (grupo C) e 36 com pré-eclâmpsia (13 com EOPE e 23 com LOPE). O grupo LOPE apresentou um aumento significativo de peso e aumento limítrofe no índice de massa corporal ao final da gestação em relação aos outros grupos, o que é compatível com a origem metabólica, associada à obesidade, atribuída a esta forma da doença. As mulheres grávidas do EOPE apresentaram uma redução limítrofe no número de eritrócitos e uma diminuição significativa no número de plaquetas e um aumento significativo de reticulócitos, ferro sérico e ferritina quando comparados ao grupo C e LOPE. O grupo EOPE demonstrou um aumento significativo na estabilidade osmótica dos eritrócitos em relação aos demais grupos. A análise hemodinâmica por ultrasonografia Doppler da artéria oftálmica mostrou que ambos os grupos de mulheres grávidas com PE apresentaram alterações compatíveis com a ocorrência de hiperfluxo no território orbital. Essas alterações hemodinâmicas foram associadas a alterações nos índices hematimétricos.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia, Ganho de Peso, Células Vermelhas do Sangue, Estabilidade de Membrana, Artéria Oftálmica, Doppler

Abstract

[Are there differences in the anthropometric, hemodynamic, hematologic and biochemical profiles between late- and early-onset preeclampsia?]

Abstract

Preeclampsia (PE) is classified in early- (EOPE) and late-onset PE (LOPE) when present before or after 34 gestation weeks, respectively. This transversal study aimed to investigate the differences and possible associations existing in the anthropometric, hemodynamic, hematologic and biochemical profiles of late- and early-onset preeclampsia. The study included 65 volunteers admitted to a tertiary hospital in Brazil, 29 normotensive and 36 with preeclampsia (13 with EOPE and 23 with LOPE). Pregnant women with LOPE presented greater weight gain and borderline increase in body mass index at the end of gestation in relation to the other groups, which is compatible with the metabolic origin, associated with obesity, attributed to this form of the disease. Pregnant women with EOPE presented a borderline reduction in the number of erythrocytes and a significant decrease in the number of platelets, in addition to a significant increase in reticulocytes, serum iron and ferritin when compared to normotensive pregnant women and pregnant women with LOPE. A significant increase in osmotic stability of erythrocytes was observed in the EOPE group in relation to groups. Hemodynamic analysis by Doppler ultrasonography of the ophthalmic artery showed that both groups of pregnant women with PE presented alterations compatible with the occurrence of hyperflow in the orbital territory. These hemodynamic changes were associated with changes in hematimetric indices.

Key words: Pre-eclampsia, Weight Gain, Red Blood Cells, Membrane Stability

Introduction

Preeclampsia (PE) is a complex multifactorial syndrome with etiology not yet established, which affects between 5 and 7% of pregnancies worldwide [1, 2]. The diversity of repercussions in the pregnant woman and in the fetus has been investigated in light of its classification in early- (EOPE) and late-onset PE (LOPE), when present before and after 34 weeks of gestation, respectively [3]. This classification seems to reflect etiopathogenic mechanisms that begin at different moments of gestation. Some authors highlight the occurrence of differences between these two types of PE in terms of the anthropometric, hematologic and biochemical profiles of the pregnant woman and the maternal-fetal outcomes, so that how earlier is its onset, worse is the maternal-fetal outcome [3, 4]. This would justify, at least in part, the theory that EOPE and LOPE would have different pathophysiologies; however, there are controversies on the subject [5].

In PE neurologic changes are the most serious and potentially fatal maternal complications. Epidemiological studies have shown that neurologic complications occur more frequently in EOPE than in LOPE [6, 7]. Notably, this suggests that EOPE is the most severe form of PE, promoting neurologic complications due to central vascular alterations [8-11]. However, the factors that contribute to neurologic involvement during EOPE are not well known [7].

The maternal cerebral vasculature can be studied by Doppler of the ophthalmic artery (OA). Doppler velocimetric findings of OA can be extrapolated to the cerebrovascular circulation [12-14], because of origin in the internal carotid, which is responsible by much of the cerebral circulation, and by their embryological and functional similarities with small-caliber cerebral vessels [15]. Previous studies on the subject have identified in PE the presence of cerebrovascular hyperflow, which many authors have termed maternal centralization, in analogy to what occurs in the fetal cerebral circulation in situations of hypoxia [12, 16, 17]. Several authors have previously described the hemodynamic profile of OA in pregnant women with PE [17-19], but there are no specific publications on this vascular pattern in EOPE and LOPE.

The oxidative aggression to the endothelium, leading to inflammation and culminating in an increase in vascular resistance, with consequent elevation in blood pressure, is one of the mechanisms accepted to explain the installation of PE [20, 21]. Blood flow control is directly associated with tissue perfusion and the erythrocyte has an active function in this process. For the good performance of its functions, the erythrocyte must be able to undergo ex-

tensive passive deformation, without suffering lysis, when passing through small-capillary capillaries. This is possible thanks to the viscoelasticity of the erythrocyte membrane.

It is known that the relative content of cholesterol and phospholipids (with polyunsaturated fatty acids), which depends on blood lipid levels, is essential for maintaining the fluidity, deformability, stability and functionality of erythrocytes [22]. Since PE is related to dyslipidemia, oxidative stress, and hematologic and vascular changes [23-25], it is possible that these changes are associated with each other. Within this context, it makes perfect sense to consider the participation of the erythrocyte in the etiology of PE/eclampsia, even because it has been associated with disease progression, particularly due to the strong association between this cell and oxidative stress [26, 27].

In this study, the possible association of alterations in erythrocyte behavior with PE will be investigated through the analysis of osmotic stability. The analysis of the erythrocyte behavior in an hyposmotic gradient is a powerful method that reflects the deformability [28], stability [29, 30] and the membrane composition of these cells, allowing the investigation of the influences of the lipid blood levels [31] oxidative aggression [26], among other factors. Although there are already studies on the osmotic stability of erythrocytes in both pregnancy and PE, they are usually presented as a percentage of hemolysis as a function of time [32] and lysis ratio at specific salt concentration [26]. In this work, the osmotic stability of erythrocytes was evaluated by statistical treatment of the hyposmotic gradient lysis curve, using variables and indices that have been very useful in the evaluation of several other physiologic or pathologic conditions [29, 33]

Faced with the need to better understand the differences between EOPE and LOPE, this study compared anthropometric, hemodynamic, biochemical, hematologic and osmotic stability profiles of red blood cells between these two types of PE.

Material and Methods

Population

The study project was registered and approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia (CEP-UFU) under the number CAAE 23236614.4.000.5152. All patients signed a Free and Informed Consent Form. The study included 65 pregnant women admitted to the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia between December 2014 and June 2017. Pregnant patients without pathologic

changes in pressure and obstetric routine exams, without signs of labor, and gestational age greater than or equal to 39 weeks were selected to form the control group (n = 29). The problem group consisted of pregnant patients who met the criteria defined for diagnosis of PE (n = 36) by the American College of Obstetricians and Gynecologists [34].

The problem group was stratified into subgroups of pregnant women with EOPE (n = 13) or LOPE (n = 23), according to the gestational age of onset of signs/symptoms of the disease [35].

All the pregnant women included in the study took folic acid supplementation (5 mg/day) in the first trimester and started supplementation of elemental iron (40 mg/day) at the second trimester of pregnancy.

Volunteers with a history of thyroid diseases, erythrocytopathies, chronic hypertension, autoimmune diseases, diabetes, renal diseases and current use of anticonvulsants, antidepressants, magnesium sulfate, tobacco, alcohol and/or other drugs, and patients with gestations associated with congenital (toxoplasma, cytomegalovirus) and sexually transmitted diseases, twin pregnancy, fetal malformation, restriction of fetal growth not associated with hypertensive disease, and natimortality were excluded from the study.

Blood collection

Blood samples were collected by venipuncture in tubes with K3EDTA or without anticoagulant (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, Brazil), and were stored at 0-4 °C until the time of each test. Blood collection was performed on admission of the volunteers at the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia (CH-FUU).

Determination of osmotic stability of erythrocytes

A duplicate set of test tubes (24) containing 1 mL of 0.1-1.0 g/dL NaCl solution (Labsynth, Diadema, Brazil) was preincubated at 37 °C in a thermostated water bath (Marcogni, Model MA 184, Piracicaba, SP, Brazil) for 10 minutes. After addition of 20 µL of whole blood, the tubes were gently shaken, reincubated for 30 minutes and then centrifuged at 1600 x g in a Hitachi Koki centrifuge (model CFR15XRII, Hitachinaka, Japan) for 10 minutes, for removal of the supernatant and analysis of the amount of hemoglobin released in the hemolysis by the absorbance reading at 540 nm in a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu TM, UV1650TC model, Japan).

The graphs of A₅₄₀ as a function of the NaCl (X) concentration were adjusted by non-linear sigmoidal regression, according to the Boltzmann equation:

$$A_{540} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{\min} \quad (1),$$

where A_{max} and A_{min} represent respectively the maximum and minimum plateaus of A₅₄₀; H₅₀ is the concentration of NaCl capable of promoting 50% hemolysis and dX represents the change in NaCl concentration responsible for 100% hemolysis [31]

The analysis of osmotic stability of erythrocytes was performed up to 24 hours after blood collection.

Doppler ultrasonography of the ophthalmic artery

The OA Doppler was performed on Medison ultrasound equipment (model SonoAce 8800MT, Japan), by a single examiner with more than 10 years of experience. OA was insonated in the medial region of the optic nerve with a linear transducer at 7-10 MHz frequency, 50 Hz filter, 5 kHz pulse repetition frequency and 7 mm sample volume [12, 13]. Only one eye was examined because previous studies did not show significant differences between the eyes [12, 36].

The study of Doppler velocimetry of the ophthalmic artery was performed on admission of volunteers in CH-FUU.

Determination of hematologic and biochemical parameters at the third trimester of gestation

Hematologic parameters were obtained using an automated system (Sysmex K4500; Sysmex Corporation™, Mundelein, IL, EUA). These parameters, with their respective reference values (third trimester of gestation), included: erythrocyte count (RBC), 2.71-4.43 x 10⁶/mm³; hematocrit (Ht), 28.0-40.0%; hemoglobin (Hb), 9.5-15.0 g/dL; mean corpuscular volume (MCV), 81-99 fL; mean corpuscular hemoglobin (MCH), 29-32 pg/cell; mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), 31-36 g%; red-cell distribution width (RDW), 12.7-15.3%; platelet count (Plt), 146-429 x 10³/mm³; mean platelet volume (MPV), 8.2-10.4 fL [37, 38].

Biochemical parameters were measured by an automated analyzer (Architect c8000, IL, EUA) and included: triglycerides (TGC), 131-453 mg/dL; total cholesterol (t-C), 219-349 mg/dL; high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), 48-87 mg/dL; low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), 101-224 mg/dL; very-low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C),

21-36 mg/dL; lactate dehydrogenase (LDH), 82-524 U/L; alanine aminotransferase (ALT), 2-25 U/L; aspartate aminotransferase (AST), 4-32 U/L; urea (U), 3-11 mg/dL; creatinine (Cn), 0.4-0.9 mg/dL; uric acid (UA), 3.1-6.3 mg/dL; human serum albumin (HSA), 2.3-4.2 g/dL; sodium (Na⁺), 130-148 mEq/L; potassium (K⁺), 3.3-5.1 mEq/L; indirect (iB), 0.1-0.5 mg/dL, and total bilirubin (tB), 0.1-1.1 mg/dL; serum iron (Fe), 30 193 µg/dL; and ferritin (Ferritin), 0-116 ng/mL [39, 40].

The evaluation of the presence of proteinuria and its quantification were performed on urine reagent tape (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

Statistical analysis

The normality of the data set was evaluated by the Shapiro-Wilk test. Analysis of variance (ANOVA) test, followed by Bonferroni post-hoc test, and Kruskal-Wallis test, followed by Dunn-Bonferroni post-hoc test, were used to compare the groups of normal and non-normal variables, respectively. Differences associated with p values <0.05 and 0.05<p<0.10 were considered statistically significant and borderline, respectively. Most variables were not normally distributed and, therefore, the Spearman correlation test was used to find associations between studied variables. All analyzes were performed using Origin 8.5 professional (Microcal, Northampton, MA, EUA) and SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) software packages.

Results

Fig. 1 shows a typical sigmoid curve obtained in the determination of erythrocyte membrane stability variables. The parameters H0, H50 and H100 are proportional to the osmotic fragility of the erythrocytes. Therefore, their inverse forms, 1/H0, 1 / H50 and 1/H100 are those which effectively represent the osmotic stability of those cells. dX is effectively a variable of osmotic stability of erythrocytes and, therefore, the dX/H50 and dX/Amin ratios are directly proportional to the erythrocyte membrane stability, since Amin and H50 have inverse relationships with the stability of these cells.

Fig. 2 is a schematic representation of the variation of blood flow velocity in OA as a function of the duration time of a cardiac cycle. At each ejection of blood from the left ventricle (systole), a pulse pressure, which is represented by a rapid upward curve, occurs, generating the peak systolic velocity (PSV), which is followed by sudden drop and a secondary

elevation of velocity, generating a second systolic peak (P2) and a notch (aortic notch) before the end of the systolic cycle. As the vascular diameter returns to normal, the accumulated energy provides a potential needed to promote continuous flow during diastole, which is represented in the graph by rise of the speed, followed by slow deceleration and finishing at the peak of end diastolic velocity (EDV). The interpretation of the graphical representation of an OA Doppler occurs by the analysis of the pulse wave velocity (PWV), the velocity peaks, the average velocity of a cardiac cycle (V_{mean}) and the indexes that relate the systolic and diastolic velocities: Pulsatility Index (PI), given by $(PSV-EDV)/V_{mean}$; Resistance Index (RI), given by $(PSV-EDV)/PSV$; and Peak Ratio (PR), given by $P2/PSV$. Fig. 3 shows typical Doppler velocimetry results observed in OA of normal pregnant women (Fig. 3A) and pregnant women with preeclampsia in the present study (Figures 3B and 3C). In PE, a specific alteration in the morphology of the wave, which acquires the shape of hump, is observed due to the increase in amplitude and rounding of P2, indicating the presence of hyperflow in orbital territory. The elevation of PR and P2 indicates hyperflow in orbital territory. On the other hand, the decrease in IP and IR represents an increase in the flow velocity at that location [12].

Table 1 shows the values obtained for the main variables analyzed in the three groups of this study, presented as frequency (categorical variables), median $\pm$ IQR (variables without normal distribution) and mean $\pm$ SD (normal distribution).

In relation to the anthropometric variables, there was a significant increase in weight gain and a borderline increase in BMI during gestation in the group of pregnant women with LOPE in relation to the control (C) group. The weight gain during pregnancy was also significantly higher in LOPE group than in EOPE group. In fact, the deliveries of the EOPE group volunteers were very premature, according to World Health Organization criteria, with fetal weight 48% and 37% lower than in C and LOPE groups, respectively. The weight of the placenta in the EOPE group was also significantly lower than in the other groups.

Regarding blood cell counts, there was a borderline decrease in the erythrocyte count and a significant increase in the reticulocyte index in the EOPE group when compared to the C group. A significant reduction in platelets was also observed in the EOPE group in relation to the C group.

As for the liver function biomarkers, blood levels of ALT, AST and LDH were higher in the LOPE and EOPE groups than in the C group. Blood levels of LDH were also significantly higher in EOPE group than in LOPE group.

The changes observed in these biomarkers make sense in relation to the lower levels

of HSA observed in the volunteers of the EOPE group both in relation to the C group and the LOPE group.

In the category of nitrogen excretion products, urea and uric acid levels were significantly higher in the EOPE and LOPE groups than in the C group and were also higher in EOPE group than in LOPE group. The creatinine levels were higher only in the EOPE group than in the C group. There were no significant differences in the levels of indirect and total bilirubin between the groups.

Regarding electrolytes, plasma levels of Na⁺ were significantly lower in the EOPE group than in the LOPE and C groups, while K⁺ levels were significantly higher in EOPE group than in the C group.

Serum iron and ferritin levels were significantly higher in the EOPE and LOPE groups than in the C group, and also higher in EOPE group than in the LOPE group.

As for Doppler velocimetric variables, there were significantly lower values of resistance index (RI) and pulsatility index (PI) of the OA Doppler in the EOPE and LOPE groups when compared to the C group. The volunteers of the EOPE group also presented significantly higher values of P2 than C group. The PR values of EOPE and LOPE groups were significantly higher in relation to the C group.

Regarding the membrane stability variables, the values of 1/H50 of the EOPE group presented a significant increase in relation to the C group and a borderline elevation in relation to the LOPE group. The EOPE group presented a borderline reduction of H0 and a significant reduction of H100 in relation to C group, as well as a borderline reduction of H100 in relation to the LOPE group.

In order to determine if the aforementioned differences would have been driven by the occurrence of growth restriction, the statistical analyzes applied to the data in Table 1 were redone after the withdrawal of the volunteers with newborns whose growth was below the 10th percentile (results not shown), with probable etiology associated with pre-eclampsia. In total, 3 cases were withdrawn in the EOPE group and 1 in the LOPE group. Significant statistical differences were preserved in this new analysis, except for reticulocyte index and parameter H100. Differences with borderline significance were also preserved, except for the number of erythrocytes and the membrane stability variable H0.

The matrices for the correlations between all pairs of variables in the groups of pregnant women (normotensive, LOPE and EOPE, respectively) are not presented in this study, but the Spearman's correlation coefficient (ρ) values, along with their respective p values,

were mentioned in the discussion, whenever they were useful to support findings reported here.

Discussion

In the present study, the EOPE group presented the worst obstetric results when compared to the other groups, with very premature births, lower fetal and placental weights, and greater maternal systemic impairment, demonstrated by significant changes in hematological, biochemical and Doppler velocimetric indices of AO. On the other hand, the LOPE group had a full-term birth, fetal weight close to 3 kg and placental weight without significant difference in relation to C group, and lower maternal systemic compromise when compared to the EOPE group.

Differences in gestational outcomes and maternal involvement suggest the presence of two distinct clinical phenotypes for PE [1, 41]. According to some authors, LOPE, described as its mild form, is associated with normal or slightly altered placentation, with clinical manifestations resulting from a previous endothelial compromise, which is exacerbated by pregnancy, and, therefore, this form of the disease is called of maternal PE. On the other hand, EOPE, a determinant of most serious cases, reflects an inadequate placentation, with the release of antiangiogenic and pro-oxidant factors, responsible for the promotion of endothelial lesion, and for this reason this form of the disease is referred to as placental PE [42]. Endothelial dysfunction is the common pathway to all forms of presentation of the disease [5]. In PE there is an imbalance between pro and antioxidant factors, which characterizes the state of oxidative stress and can be proven by the elevation of biomarkers of lipid peroxidation in relation to normotensive pregnant women [26, 43].

Erythrocytes are quite vulnerable to reactive oxygen species (ROS), since their polyunsaturated fatty acids are susceptible to lipid peroxidation [44, 45]. This process leads to changes in the lipid bilayer of the erythrocyte membrane, affecting its fluidity and stability. With lysis, the iron released from hemoglobin favors the formation of free radicals superoxide ($O_2\bullet$) and hydroxyl ($HO\bullet$), thus amplifying the cascade of oxidative damages. This is why membrane stability of erythrocytes should be a determining factor in the progression of preeclampsia [26].

Previous studies indicate that both gestation and PE are associated with changes in blood rheological behavior [46-51]. Although PE was previously associated with increased

osmotic fragility of erythrocytes [43], in this study the EOPE group showed a significant increase in membrane osmotic stability in relation to the C group and a borderline increase in relation to the LOPE group. These results suggest that EOPE and LOPE actually have different etiologies. As osmotic stability is a good indicator of the extent of cellular impairment by lipid peroxidation [26], it is possible that this change in erythrocyte behavior is due to exacerbation of oxidative stress. The *in vivo* exacerbation of this oxidative aggression to erythrocytes would reduce their ability to deform and decrease their longevity, increasing their removal rate, the bilirubin production and the ferritin circulating levels, with consequent decrease in erythrocyte counts and acceleration of erythropoiesis, which is trivially associated with increased reticulocyte count. In fact, the EOPE group showed lower counts of red blood cells, higher levels of ferritin and increased reticulocyte index.

In this complex situation, the involvement of erythrocytes in the pathophysiology of PE also has other implications that can be inferred from correlations presented by blood variables. Although the deformability of the erythrocyte membrane is related to its fluidity, which is impaired by oxidative stress, it is also influenced by cytoplasmic viscosity, which in turn is regulated by mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and intracellular volume of water. The cytoplasmic viscosity of the erythrocyte rises with increasing hemoglobin concentration, such that excessive elevation will disturb the deformability of the erythrocyte. Thus, MCHC reference values reflect physiologic patterns of viscoelasticity of erythrocytes. In this sense, the negative correlation observed between MCHC and the stability variable dX/Amin in the control group ($\rho = -0.392$; $p = 0.047$) should be meaning that, within the physiologic reference range of this variable, lower MCHC values are associated with greater osmotic stability, certainly because lower hemoglobin levels mean less impact of osmotic pressure in the promotion of *in vitro* lysis of the cells of normotensive pregnant women. For some reason not yet understood, in the LOPE group, the positive correlation of MCHC with the erythrocyte membrane stability was manifested in relation to the H50 ($\rho = +0.465$; $p = 0.039$) and H100 ($\rho = +0.647$; $p = 0.002$) variables. But the positive nature of this association should mean that also in LOPE lower hemoglobin concentrations are associated with greater osmotic stability of erythrocytes. Indeed, the MCHC values should remain in a critical range to avoid compromising the stability and deformability of red blood cells.

Although the osmotic stability of erythrocytes *in vitro* does not strictly reflect erythrocyte stability *in vivo*, since the hypo-osmolarity conditions that leads to the *in vitro* hemolysis will not occur *in vivo*, it helps to understand erythrocyte behavior *in vivo*, where a broader set

of mechanisms is at work. In vivo, the mechanical friction of erythrocytes with vessel wall, especially in smaller caliber capillaries, is a more relevant threat to the maintenance of erythrocyte stability. This mechanical aggression is aggravated by an increase in blood pressure. The influence of pressure on blood rheology is associated with an increase in the rate of removal and elevation of erythrocyte generation. The strong positive correlations observed between dX and with SBP ($\rho = + 0.865$; $p = 0.006$) and DBP ($\rho = + 0.740$; $p = 0.036$) and dX/H50 with SBP ($\rho = + 0.636$; $p = 0.036$) and DBP ($\rho = + 0.664$; $p = 0.026$) reveal that the increase in blood pressure is also associated with the increase in erythrocyte stability in vitro, certainly due to an increase in the proportion of reticulocytes due to increase in the mechanical aggression by arterial hypertension on erythrocytes weakened due exacerbation of oxidative aggression on their membrane lipids. The high pressure must have contributed to the removal of the most fragile cells, such that the in vitro analysis is using only the more stable cells, which are remnants of a process of mechanical selection of stability. The negative and strong correlations of MCHC with DBP ($\rho = - 0.851$; $p < 0.001$) and SBP ($\rho = - 0.911$; $p < 0.001$) in the EOPE group indicate a very strong association between increased blood pressure and decline in MCHC. This should mean that this decline in MCHC is associated with change in the dynamics of the formation and removal of red blood cells. High MCHC values are associated with increased viscosity, which, in view of the elevation in blood pressure, would compromise the deformability and stability of the erythrocyte, and consequently the dynamics of gas exchange in the pregnant woman. As smaller MCHC values were related to osmotically more stable erythrocytes in pregnant women with LOPE, as stated earlier, this suggests that the MCHC decrease is a compensatory mechanism to ensure the preservation of the erythrocytes (**Fig. 4**), in view of the elevated pressure present in the disease, ensuring the preservation of the pregnant woman's life.

Returning to the mechanical selection hypothesis, it is possible that the criterion for selection is exactly the hemoglobin concentration. The erythrocytes with higher hemoglobin content would offer more resistance and would be more vulnerable to damage and removal, leaving unchanged the erythrocytes populations with lower hemoglobin content and with greater deformability and stability both in the presence of mechanical aggression in vivo and in the presence of aggression by osmotic expansion in a low osmolarity medium in vitro (Fig. 4).

The absence of a significant correlation between MCHC and indirect bilirubin ($\rho = - 0.033$; $p = 0.932$) total bilirubin ($\rho = - 0.336$; $p = 0.262$) in EOPE should mean the existence

of a much more complex environment in this condition, with a larger group of factors governing bilirubin levels. This is in fact true in light of the interference of oxidative stress on the deformability, stability and lysis of erythrocytes, on the one hand, and the interference of hepatic dysfunction on bilirubin levels, on the other hand. Indeed, a significant and strong positive correlation was observed between AST and t-B levels ($\rho = + 0.500$; $p = 0.019$) levels in EOPE.

Although erythropoiesis accelerates in normal gestation, with increased reticulocyte release in the circulation [52], erythropoiesis becomes even more accelerated in EOPE, as can be inferred from the higher values observed in the reticulocytes index of EOPE group with respect to C group. After a few days in the bloodstream, reticulocytes completely lose their organelles and acquire the biconcave disc format that is typical of young mature erythrocytes. For this reason, the erythrocyte population in gestation is predominantly composed of young cells [47], which would be osmotically more fragile [48], due to the occurrence of progressive increase in the sphericity of the erythrocyte, with reduction of diameter and thickening of the membrane during pregnancy [47, 53]. Indeed, the positive correlation observed between H50 and reticulocyte index ($\rho = + 0.524$; $p = 0.009$) in the control group means that in vitro the osmotic stability of erythrocytes decreased with increasing reticulocyte ratio in the blood of healthy pregnant women in this study. But there are reports that reticulocytes show a 10% increase in their membrane stability when compared to young erythrocytes [54]. However, due to the non-inclusion of a group of non-pregnant women, the present study could not determine the influence of gestation on the membrane stability of erythrocytes. Given the complex and non-linear nature of the relationships between the variables of the broad set of factors governing osmotic stability of erythrocytes, it is difficult to establish inferences exclusively from bivariate correlations.

Even so, some significant correlations deserve to be highlighted, especially when associated to situations where there has been greater variation, as is the case of the EOPE group in relation to normal pregnancy. In the EOPE group, in which there was an acceleration of erythropoiesis associated with hepatic dysfunction, the correlations presented by RDW are noteworthy. RDW showed significant negative correlations with TGC ($\rho = - 0.661$; $p = 0.019$), t-C ($\rho = - 0.749$; $p = 0.005$), LDL-C ($\rho = - 0.612$; $p = 0.046$) and urea ($\rho = - 0.601$; $p = 0.030$), and a positive correlation with 1/H50 ($\rho = + 0.658$; $p = 0.028$). Although high levels of RDW have been associated with excess membrane cholesterol content [55] and excessively high blood levels of cholesterol have been associated with the generation of hemolytic

anemia and morphological atypia [31, 56], the relationship of RDW with cholesterolemia should not be linear [31]. Particularly in view of the increase in reticulocyte population, another aspect of the influence of blood cholesterol levels should be manifested. This is why in the EOPE group, RDW was negatively associated to TGC, t-C and LDL-C, as previously affirmed. These correlations make even more sense in light of the possible meaning of the also negative correlation observed between RDW and urea ($\rho = -0.601$; $p = 0.030$). Although high levels of urea in the EOPE group are associated with a decline in renal function, lower levels of urea also signal the occurrence of hepatic dysfunction, which means less production of lipids. Thus, higher urea levels would also mean higher hepatic triglyceride and cholesterol production and lower RDW values, due to the hematologic context present in this group, i.e., in the presence of an increased reticulocyte population. On the other hand, the positive correlation observed between RDW and 1/H50 ($\rho = +0.658$; $p = 0.028$) shows that for the range of values of this variable presented by the EOPE group the increase in RDW was associated with an increase in erythrocyte stability. In relation to the variability existing between these parameters it is difficult to infer what is desirable and what is undesirable, because each of these variables or properties is undergoing the simultaneous influence of other variables.

This is the case of erythrocyte membrane stability, which in LOPE showed to be inversely associated with MCHC (due to the positive correlations presented by H50 ($\rho = +0.465$; $p = 0.039$) and H100 ($\rho = +0.647$; $p = 0.002$) with MCHC) and MCV values (due to the negative correlations presented by variables dX ($\rho = -0.608$; $p = 0.27$), dX/Amin ($\rho = -0.731$; $p < 0.001$) and dX/H50 ($\rho = -0.666$; $p = 0.001$) with MCV). Since MCV is governed by MCH, which is quite obvious and can be confirmed by the strong correlations observed between MCV and HCM in the three groups of this study, it seems that the increase in erythrocyte stability with the decrease in volume is due to a decrease in hemoglobin content. This makes a lot of sense, both in vivo, in which the decrease in hemoglobin content decreases cytosolic viscosity and raises the deformability and mechanical stability of erythrocytes [54], and in vitro, a situation in which the reduction in hemoglobin content decreases the osmotic pressure associated with the entry of water into the cell, especially in view of the hyposmotic condition in the external aqueous medium.

In the LOPE group, significantly higher values of weight gain and BMI in relation to the other groups suggest the participation of obesity in the etiology of the disease. In fact, higher adiposity is associated with chronic inflammation, ROS release and membrane lipoperoxidation, thus generating structural and functional damages [57, 58]. Thus, the in-

crease in lipid peroxidation, due to obesity, could trigger the disease, even in the presence of adequate placentation. In the LOPE group, the association between BMI and the osmotic stability index dX/H50 ($\rho = + 0.571$; $p = 0.041$) suggests the influence of obesity, probably due to lipoperoxidation and dyslipidemia, in increasing erythrocyte membrane stability. This type of effect exerted by blood lipids should not be surprising, since transfer of cholesterol to the erythrocyte membrane has dual effects on the stability and functionality of these cells [31].

In the presence of a hypoxemic environment, there is a reduction in peripheral vascular resistance and a compensatory increase in local flow velocity. It seems that a similar mechanism occurs in the cerebrovascular microcirculation of volunteers with EOPE, as may be inferred from the behavior of some hemodynamic indices of the OA.

Positive correlations of RI with erythrocyte counts ($\rho = + 0.694$; $p = 0.026$) and hemoglobin levels ($\rho = + 0.702$; $p = 0.024$) show that the lower RI values observed in this group are associated with lower red cell counts, which would require a compensatory increase in local flow velocity. Indeed, the PR increase that was observed in the EOPE group and the negative correlation observed between PR and hemoglobin ($\rho = - 0.669$; $p = 0.035$), also in this group, indicate that the blood flow changes observed in OA are associated with changes in hemoglobin levels.

On the other hand, exacerbation of cerebral vasodilation is responsible for loss of self-regulation, extravasation of plasma and development of posterior reversible encephalopathy, known as PRESS Syndrome [14] and considered the terminal stage of preeclampsia.

The negative association observed between placental weight and MCV ($\rho = - 0.618$; $p = 0.004$), MCH ($\rho = - 0.458$; $p = 0.042$) and MCHC ($\rho = - 0.519$; $p = 0.019$) indices in the LOPE group indicates that the mechanical selection of smaller erythrocytes, with lower hemoglobin content, is associated with better gestational outcome. A similar protective phenomenon appears to occur in the central territory, since smaller red cells and lower hemoglobin levels were associated with lower central flow and thus lower risk of hydrostatic edema of the cerebral parenchyma, as can be inferred from the negative correlation observed between IR and MCV ($\rho = - 0.642$; $p = 0.045$).

Renal injury in preeclampsia is marked by increased urea and, mainly, creatinine. The elevation of these substances is related to an increase in blood pressure and a hyperdynamic cardiovascular state. Thus, there will be increased pulse pressure and, consequently, increased flow velocity of the ophthalmic artery. Indeed, this is what can be inferred by the positive associations of P2 with creatinine ($\rho = + 0.667$; $p = 0.050$) and urea ($\rho = + 0.697$; $p =$

0.025) and of PR with creatinine ($\rho = + 0.753$; $p = 0.019$) in the EOPE group.

In EOPE, the positive correlation observed between PR and VLDL-C ($\rho = - 0.904$; $p = 0.001$), lipoprotein that was associated with endothelial dysfunction [59], indicates its participation in peripheral resistance and elevation of blood pressure levels, with a consequent increase in pulse pressure and in the systolic peaks of the ophthalmic artery.

In the present study, PR values, the main indicator of changes in flow velocity in the Doppler velocimetry of the OA (Fig. 3), differentiated the cases of PE in relation to the normotensive patients, but did not demonstrate a significant difference between the LOPE and EOPE groups. In practice, PR has the power to detect PE when above 0.78 [15]. The significant difference found between P2 of the EOPE group, but not of the LOPE group, in relation to the C group (Table 1), suggests that P2 could also be used to differentiate the vascular behavior of EOPE in relation to LOPE. In fact, P2 values above 24.6 cm/s in the first trimester of gestation were associated with a prediction of the risk of developing EOPE [60].

It is possible that the stratification of PE on the basis of a vascular referential capable of differentiating EOPE from LOPE could better clarify the differences in the complex relationships between the anthropometric, hemodynamic, hematologic and biochemical profiles of these two forms of preeclampsia.

It is important to emphasize that the control group used here may be a limitation of this study, since this group consisted of volunteers who had full term gestation, which may raise doubts as to whether the hematologic findings found in the EOPE group can in fact be attributed to pre-eclampsia or whether they are inherent to existing differences in gestational age between the two groups, where there is a single reference range for each hematologic and biochemical variable for the whole third trimester of gestation [61].

Aknowledgments

N. Penha-Silva was supported by a scientific productivity grant from “Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento” (CNPq).

References

1. H. Valensise, B. Vasapollo, G. Gagliardi, and G. P. Novelli, "Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease," *Hypertension*, vol. 52, no. 5, pp. 873-80, 2008.
2. E. Abalos, C. Cuesta, A. L. Grosso, D. Chou, and L. Say, "Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review," *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 170, no. 1, pp. 1-7, 2013.
3. C. W. Redman, and I. L. Sargent, "Latest advances in understanding preeclampsia," *Science*, vol. 308, no. 5728, pp. 1592-4, 2005.
4. Z. S. Reis, E. M. Lage, P. G. Teixeira, L. B. Porto, L. R. Guedes, E. C. Oliveira, and A. C. Cabral, "[Early-onset preeclampsia: is it a better classification for maternal and perinatal outcomes?]," *Rev Bras Ginecol Obstet*, vol. 32, no. 12, pp. 584-90, 2010.
5. D. Raymond, and E. Peterson, "A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia," *Obstet Gynecol Surv*, vol. 66, no. 8, pp. 497-506, 2011.
6. M. J. Cipolla, "Cerebrovascular function in pregnancy and eclampsia," *Hypertension*, vol. 50, no. 1, pp. 14-24, 2007.
7. M. P. Schreurs, C. A. Hubel, I. M. Bernstein, A. Jeyabalan, and M. J. Cipolla, "Increased oxidized low-density lipoprotein causes blood-brain barrier disruption in early-onset preeclampsia through LOX-1," *Faseb j*, vol. 27, no. 3, pp. 1254-63, 2013.
8. M. A. Belfort, G. R. Saade, C. Grunewald, G. A. Dildy, M. A. Varner, and H. Nisell, "Effects of blood pressure on orbital and middle cerebral artery resistances in healthy pregnant women and women with preeclampsia," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 180, no. 3 Pt 1, pp. 601-7, 1999.
9. A. Marra, M. Vargas, P. Striano, L. Del Guercio, P. Buonanno, and G. Servillo, "Posterior reversible encephalopathy syndrome: the endothelial hypotheses," *Med Hypotheses*, vol. 82, no. 5, pp. 619-22, 2014.
10. O. Nevo, J. F. Soustiel, and I. Thaler, "Maternal cerebral blood flow during normal pregnancy: a cross-sectional study," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 203, no. 5, pp. 475.e1-6, 2010.
11. G. G. Zeeman, M. R. Hatab, and D. M. Twickler, "Increased cerebral blood flow in preeclampsia with magnetic resonance imaging," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 191, no. 4, pp. 1425-9, 2004.
12. A. L. Diniz, A. F. Moron, M. C. dos Santos, N. Sass, C. R. Pires, and C. L. Debs, "Oph-

- thalmic artery Doppler as a measure of severe pre-eclampsia," *Int J Gynaecol Obstet*, vol. 100, no. 3, pp. 216-20, 2008.
13. T. H. Williamson, and A. Harris, "Color Doppler ultrasound imaging of the eye and orbit," *Surv Ophthalmol*, vol. 40, no. 4, pp. 255-67, 1996.
 14. S. C. Kane, S. P. Brennecke, and F. da Silva Costa, "Ophthalmic artery Doppler analysis: a window into the cerebrovasculature of women with pre-eclampsia," *Ultrasound Obstet Gynecol*, vol. 49, no. 1, pp. 15-21, 2017.
 15. D. S. Matias, R. F. Costa, B. S. Matias, L. Gordiano, and L. C. Correia, "Predictive value of ophthalmic artery Doppler velocimetry in relation to development of pre-eclampsia," *Ultrasound Obstet Gynecol*, vol. 44, no. 4, pp. 419-26, 2014.
 16. C. A. de Oliveira, R. A. de Sa, L. G. Velarde, F. C. da Silva, F. A. doVale, and H. C. Netto, "Changes in ophthalmic artery Doppler indices in hypertensive disorders during pregnancy," *J Ultrasound Med*, vol. 32, no. 4, pp. 609-16, 2013.
 17. M. Takata, M. Nakatsuka, and T. Kudo, "Differential blood flow in uterine, ophthalmic, and brachial arteries of preeclamptic women," *Obstet Gynecol*, vol. 100, no. 5 Pt 1, pp. 931-9, 2002.
 18. T. Hata, D. Senoh, K. Hata, and M. Kitao, "Ophthalmic artery velocimetry in preeclampsia," *Gynecol Obstet Invest*, vol. 40, no. 1, pp. 32-5, 1995.
 19. A. S. Barbosa, A. K. Pereira, Z. S. Reis, E. M. Lage, H. V. Leite, and A. C. Cabral, "Ophthalmic artery-resistive index and evidence of overperfusion-related encephalopathy in severe preeclampsia," *Hypertension*, vol. 55, no. 1, pp. 189-93, 2010.
 20. M. J. Bell, "A historical overview of preeclampsia-eclampsia," *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, vol. 39, no. 5, pp. 510-8, 2010.
 21. B. Huppertz, "Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis," *Hypertension*, vol. 51, no. 4, pp. 970-5, 2008.
 22. A. Chabanel, M. Flamm, K. L. Sung, M. M. Lee, D. Schachter, and S. Chien, "Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity," *Biophys J*, vol. 44, no. 2, pp. 171-6, 1983.
 23. C. N. Spracklen, C. J. Smith, A. F. Saftlas, J. G. Robinson, and K. K. Ryckman, "Maternal hyperlipidemia and the risk of preeclampsia: a meta-analysis," *Am J Epidemiol*, vol. 180, no. 4, pp. 346-58, 2014.
 24. N. Z. Dordevic, G. M. Babic, S. D. Markovic, B. I. Ognjanovic, A. S. Stajn, R. V. Zikic, and Z. S. Saicic, "Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclampsia in women," *Reprod Toxicol*, vol. 25, no. 2, pp. 213-8, 2008.

25. L. M. Amaral, M. W. Cunningham, Jr., D. C. Cornelius, and B. LaMarca, "Preeclampsia: long-term consequences for vascular health," *Vasc Health Risk Manag*, vol. 11, pp. 403-15, 2015.
26. C. M. Spickett, J. Reglinski, W. E. Smith, R. Wilson, J. J. Walker, and J. McKillop, "Erythrocyte glutathione balance and membrane stability during preeclampsia," *Free Radic Biol Med*, vol. 24, no. 6, pp. 1049-55, 1998.
27. G. Barshtein, A. Gural, N. Manny, O. Zelig, S. Yedgar, and D. Arbell, "Storage-induced damage to red blood cell mechanical properties can be only partially reversed by rejuvenation," *Transfus Med Hemother*, vol. 41, no. 3, pp. 197-204, 2014.
28. J. A. Chasis, and N. Mohandas, "Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations," *J Cell Biol*, vol. 103, no. 2, pp. 343-50, 1986.
29. M. V. de Freitas, L. F. Marquez-Bernardes, L. R. de Arvelos, L. F. Paraiso, E. O. A. F. Goncalves, C. Mascarenhas Netto Rde, M. B. Neto, M. S. Garrote-Filho, P. C. de Souza, and N. Penha-Silva, "Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate," *Hematology*, vol. 19, no. 7, pp. 424-30, 2014.
30. M. Bernardino Neto, E. B. de Avelar, Jr., T. S. Arantes, I. A. Jordao, J. C. da Costa Huss, T. M. de Souza, V. A. de Souza Penha, S. C. da Silva, P. C. de Souza, M. Tavares, and N. Penha-Silva, "Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables," *Biorheology*, vol. 50, no. 5-6, pp. 305-20, 2013.
31. M. da Silva Garrote-Filho, M. Bernardino-Neto, and N. Penha-Silva, "Influence of Erythrocyte Membrane Stability in Atherosclerosis," *Curr Atheroscler Rep*, vol. 19, no. 4, pp. 17, 2017.
32. M. S. Magid, M. Perlin, and E. L. Gottfried, "Increased erythrocyte osmotic fragility in pregnancy," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 144, no. 8, pp. 910-4, 1982.
33. G. S. Lemos, L. F. Marquez-Bernardes, L. R. Arvelos, L. F. Paraiso, and N. Penha-Silva, "Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes," *Cell Biochem Biophys*, vol. 61, no. 3, pp. 531-7, 2011.
34. "Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy," *Obstet Gynecol*, vol. 122, no. 5, pp. 1122-31, 2013.
35. P. von Dadelszen, L. A. Magee, and J. M. Roberts, "Subclassification of preeclampsia,"

- Hypertens Pregnancy, vol. 22, no. 2, pp. 143-8, 2003.
36. D. S. Matias, R. F. Costa, B. Matias, L. Gordiano, and L. C. Correia, "Ophthalmic artery Doppler velocimetric values in pregnant women at risk for preeclampsia," *J Ultrasound Med*, vol. 31, no. 10, pp. 1659-64, 2012.
 37. A. J. Balloch, and M. N. Cauchi, "Reference ranges for haematology parameters in pregnancy derived from patient populations," *Clin Lab Haematol*, vol. 15, no. 1, pp. 7-14, 1993.
 38. E. J. van Buul, E. A. Steegers, H. W. Jongsma, T. K. Eskes, C. M. Thomas, and P. R. Hein, "Haematological and biochemical profile of uncomplicated pregnancy in nulliparous women; a longitudinal study," *Neth J Med*, vol. 46, no. 2, pp. 73-85, 1995.
 39. M. Abbassi-Ghanavati, L. G. Greer, and F. G. Cunningham, "Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians," *Obstet Gynecol*, vol. 114, no. 6, pp. 1326-31, 2009.
 40. D. James, P. Steer, C. Weiner, B. Gonik, C. Crowther, S. Robson, and M. Ramsay, "Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians," *Obstet Gynecol*, vol. 115, no. 4, pp. 868; author reply 868-9, 2010.
 41. A. L. Tranquilli, G. Dekker, L. Magee, J. Roberts, B. M. Sibai, W. Steyn, G. G. Zeeman, and M. A. Brown, "The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP," *Pregnancy Hypertens*, vol. 4, no. 2, pp. 97-104, 2014.
 42. B. Thilaganathan, "Placental syndromes: getting to the heart of the matter," *Ultrasound Obstet Gynecol*, vol. 49, no. 1, pp. 7-9, 2017.
 43. C. Abad, M. J. Carrasco, S. Pinero, E. Delgado, D. I. Chiarello, A. Teppa-Garran, T. Proverbio, F. Proverbio, and R. Marin, "Effect of magnesium sulfate on the osmotic fragility and lipid peroxidation of intact red blood cells from pregnant women with severe preeclampsia," *Hypertens Pregnancy*, vol. 29, no. 1, pp. 38-53, 2010.
 44. A. Constantinescu, D. Han, and L. Packer, "Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes," *J Biol Chem*, vol. 268, no. 15, pp. 10906-13, 1993.
 45. M. Suhail, S. Patil, S. Khan, and S. Siddiqui, "Antioxidant Vitamins and Lipoperoxidation in Non-pregnant, Pregnant, and Gestational Diabetic Women: Erythrocytes Osmotic Fragility Profiles," *J Clin Med Res*, vol. 2, no. 6, pp. 266-73, 2010.
 46. L. Heilmann, "Blood rheology and pregnancy," *Baillieres Clin Haematol*, vol. 1, no. 3, pp. 777-99, 1987.
 47. S. Lurie, Y. Gidron, I. Piper, Z. Ben-Aroya, O. Sadan, M. Boaz, and M. Glezerman,

- "Memory performance in late pregnancy and erythrocyte indices," *J Soc Gynecol Investig*, vol. 12, no. 4, pp. 293-6, 2005.
48. S. Lurie, and Y. Mamet, "Red blood cell survival and kinetics during pregnancy," *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 93, no. 2, pp. 185-92, 2000.
 49. L. Y. Wang, "[Changes in blood visco-elasticity in normal pregnancy and pregnancy induced hypertension]," *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, vol. 28, no. 12, pp. 711-3, 758, 1993.
 50. G. F. von Tempelhoff, E. Velten, A. Yilmaz, G. Hommel, L. Heilmann, and J. Koscielny, "Blood rheology at term in normal pregnancy and in patients with adverse outcome events," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 42, no. 2, pp. 127-39, 2009.
 51. G. F. von Tempelhoff, S. Ullrich, and L. Heilmann, "[Erythrocyte deformability in pregnancy-induced hypertension]," *Zentralbl Gynakol*, vol. 116, no. 3, pp. 160-3, 1994.
 52. T. W. Harstad, R. A. Mason, and S. M. Cox, "Serum erythropoietin quantitation in pregnancy using an enzyme-linked immunoassay," *Am J Perinatol*, vol. 9, no. 4, pp. 233-5, 1992.
 53. S. Lurie, and D. Danon, "Life span of erythrocytes in late pregnancy," *Obstet Gynecol*, vol. 80, no. 1, pp. 123-6, 1992.
 54. N. Mohandas, and P. G. Gallagher, "Red cell membrane: past, present, and future," *Blood*, vol. 112, no. 10, pp. 3939-48, 2008.
 55. G. Lippi, F. Sanchis-Gomar, E. Danese, and M. Montagnana, "Association of red blood cell distribution width with plasma lipids in a general population of unselected outpatients," *Kardiol Pol*, vol. 71, no. 9, pp. 931-6, 2013.
 56. R. A. Cooper, E. C. Arner, J. S. Wiley, and S. J. Shattil, "Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect," *J Clin Invest*, vol. 55, no. 1, pp. 115-26, 1975.
 57. E. Herrera, "Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus," *Eur J Clin Nutr*, vol. 54 Suppl 1, pp. S47-51, 2000.
 58. P. Brizzi, G. Tonolo, F. Esposito, L. Puddu, S. Dessole, M. Maioli, and S. Milia, "Lipoprotein metabolism during normal pregnancy," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 181, no. 2, pp. 430-4, 1999.
 59. A. Barden, L. J. Beilin, K. Both, J. Ritchie, P. Leedman, B. N. Walters, and C. A. Michael, "Effects of lipoproteins from pre-eclamptic women on umbilical endothelial cell 6-oxo-prostaglandin f1alpha and endothelin 1 synthesis, and nitric oxide synthase 3 mRNA expression," *Clin Sci (Lond)*, vol. 97, no. 6, pp. 697-706, 1999.

60. J. A. Alves, S. P. Brennecke, and F. da Silva Costa, "OS088. First trimester triple vascular test for pre-eclampsia prediction," *Pregnancy Hypertens*, vol. 2, no. 3, pp. 226, 2012.
61. F. G. Cunninhmann, "Normal reference ranges for laboratory values in pregnancy", Up To Date. 2017. Available at: <[http.uptodate.online](http://uptodate.online)>. Accessed 16/12/2017.

Legends of Figures

Fig 2.1. Typical curve of osmotic stability of erythrocytes. The lower plateau defines the $A_{\min}$ variable, which represents the amount of basal hemolysis present in the blood sample of each study volunteer. The decrease in the tonicity of the medium is associated with increased lysis of erythrocytes and release of hemoglobin in the solution, resulting in increased absorbance at 540 nm with formation of a curve of sigmoidal nature whose upper plateau defines the $A_{\max}$ variable, which represents the occurrence of 100% hemolysis. The curve passes through an intermediate point defining the H_{50} variable, which represents the concentration of NaCl required to promote 50% hemolysis. The saline concentration at the starting point of the curve defines the H_0 variable, which is the saline concentration required to initiate in vitro hemolysis and which can be calculated by the formula $H_0 = H_{50} - 4dX/2$. The saline concentration at the point where the in vitro lysis reaches its maximum plateau defines the H_{100} variable, which represents the saline concentration necessary to promote total lysis of the red blood cells, being calculated by the formula $H_{100} = H_{50} + 4dX/2$. The dX variable represents a quarter of the variation in saline concentration required to promote 100% hemolysis.

Fig 2.2. Graphical representation of the Doppler velocimetry of ophthalmic artery. The X-axis represents the time (seconds) and the Y-axis represents the flow velocity (cm/s). A rapid increase in velocity is observed, with a peak systolic velocity (PSV), followed by a rapid fall and a new velocity rise with the formation of a second rounded systolic peak (P2), followed by the aortic notch, which closes the systolic cycle. Then there is an increase in velocity with formation of the diastolic phase of the pulse wave velocity (PWV), which ends with the end-diastolic velocity (EDV). The P2/PSV ratio is referred to as Peak Ratio [18].

Fig. 2.3. Representation of Doppler velocimetry of ophthalmic artery in a normotensive volunteer (PR = 0.56; P2 = 24.25) (a) and in volunteers with late-onset (LOPE: PR = 0.78; P2 = 25.24) (b) and early-onset (EOPE = 0.93; P2 = 35.23) (c). PR is the P2/PSV ratio and P2 is the second peak systolic velocity.

Fig.2.4. Mechanical selection and increased osmotic stability of erythrocytes in preeclampsia.

Table 2.1. Comparisons of the values of variables from normotensive pregnant women and pregnant women with late onset preeclampsia (LOPE) and early onset preeclampsia (EOPE), presented as frequency*, median $\pm$ IQR[§] or mean $\pm$ SD[†], at the third trimester of pregnancy

Variables		Normotensive	LOPE	EOPE
Maternal Age (y)	†	25.0 $\pm$ 10.5 (28)	26.0 $\pm$ 14.0 (23)	27.0 $\pm$ 10.0 (13)
Weight Gain (kg)	§	10.0 $\pm$ 3.0 (26) ^a	20.0 $\pm$ 7.0 (9) ^{a,b}	14.0 $\pm$ 5.0 (5) ^b
BMI (kg/m ²)	§	29.2 $\pm$ 5.1 (27) ^a	32.0 $\pm$ 8.4 (13) ^a	29.7 $\pm$ 6.2 (6)
Gestacional Age (w)	§	40.0 $\pm$ 1.0 (29) ^{a,b}	38.0 $\pm$ 2.0 (20) ^{b,c}	31.5 $\pm$ 4.0 (13) ^{a,c}
Birth Weight (kg)	§	3.5 $\pm$ 0.5 (28) ^{a,b}	2.9 $\pm$ 0.6 (22) ^{b,c}	1.8 $\pm$ 0.9 (11) ^{a,c}
Placenta Weight (g)	§	590.0 $\pm$ 80.0 (28) ^a	512.5 $\pm$ 160.0 (22) ^b	337.5 $\pm$ 200.0 (12) ^{a,b}
SBP (mmHg)	§	120.0 $\pm$ 10.0 (28) ^{a,b}	150.0 $\pm$ 30.0 (23) ^a	150.0 $\pm$ 20.0 (13) ^b
DBP (mmHg)	§	70.0 $\pm$ 10.0 (28) ^{a,b}	100 $\pm$ 20.0 (23) ^a	100.0 $\pm$ 10.0 (13) ^b
RBC (10 ⁶ cells/mm ³)	†	4.15 $\pm$ 0.57 (29) ^a	4.08 $\pm$ 0.44 (22)	3.78 $\pm$ 0.68 (13) ^a
Ht (%)	†	34.6 $\pm$ 3.8 (29)	34.7 $\pm$ 5.6 (22)	33.2 $\pm$ 3.8 (13)
Hb (g/dL)	†	12.0 $\pm$ 1.5 (29)	11.8 $\pm$ 1.8 (22)	11.3 $\pm$ 1.3 (13)
MCV (fL)	§	85.3 $\pm$ 6.4 (29)	82.9 $\pm$ 8.9 (21)	87.3 $\pm$ 6.1 (13)
MCH (pg)	§	29.5 $\pm$ 2.7 (29)	27.9 $\pm$ 3.7 (21)	29.8 $\pm$ 2.7 (13)
MCHC (g/dL)	§	34.1 $\pm$ 1.6 (29)	33.8 $\pm$ 1.5 (21)	33.9 $\pm$ 2.3 (13)
RDW (%)	§	13.3 $\pm$ 1.3 (29)	14.0 $\pm$ 1.9 (21)	13.0 $\pm$ 1.3 (13)
Rtc Index (%)	§	1.1 $\pm$ 1.4 (27) ^a	1.4 $\pm$ 1.1 (21)	1.7 $\pm$ 1.6 (11) ^a
Plt (10 ³ cel/mm ³)	§	229.0 $\pm$ 7.0 (29) ^a	213.5 $\pm$ 102 (22) ^b	141.0 $\pm$ 52.0 (13) ^{a,b}
MPV (fL)	§	11.0 $\pm$ 2.0 (29)	10.2 $\pm$ 2.4 (21)	10.0 $\pm$ 2.3 (13)
t-C (mg/dL)	§	219.2 $\pm$ 65.0 (27)	198.0 $\pm$ 59.0 (19)	227.0 $\pm$ 61.9 (12)
HDL-C (mg/dL)	§	59.8 $\pm$ 28 (27)	59.9 $\pm$ 13.3 (21)	60.3 $\pm$ 20.5 (12)
VLDL-C (mg/dL)	§	40.0 $\pm$ 16.0 (28)	40.5 $\pm$ 19.8 (16)	47.0 $\pm$ 31.2 (11)
LDL-C (mg/dL)	§	131.5 $\pm$ 63.3 (28)	106.0 $\pm$ 54.0 (17)	113.5 $\pm$ 66.3 (11)
TGC (mg/dL)	§	203.0 $\pm$ 111.0 (28) ^{a,b}	210.0 $\pm$ 128.0 (17) ^a	238.0 $\pm$ 121.8 (12) ^b
Proteinuria				
Proteinuria 0+	*	100.0% (29)	31.3% (5)	0% (0)
Proteinuria 1+	*	0% (0)	18.8% (3)	22.2% (2)
Proteinuria 2+	*	0% (0)	37.5% (6)	44.4% (4)
Proteinuria 3+	*	0% (0)	12.5% (2)	11.1% (1)
Proteinuria 4+	*	0% (0)	0% (0)	22.2% (2)
ALT (U/L)	§	14.9 $\pm$ 2.9 (29) ^{a,b}	17.0 $\pm$ 11.0 (23) ^a	27.0 $\pm$ 27.7 (13) ^b
AST (U/L)	§	9.0 $\pm$ 3.2 (28) ^{a,b}	12.0 $\pm$ 7.0 (23) ^a	22.0 $\pm$ 45.8 (13) ^b
LDH (U/L)	§	193.0 $\pm$ 39.0 (27) ^{a,b}	236.0 $\pm$ 49.0 (23) ^{a,c}	292.0 $\pm$ 274.0 (13) ^{b,c}
HSA (g/dL)	§	3.5 $\pm$ 0.4 (25) ^a	3.3 $\pm$ 0.6 (15) ^b	3.0 $\pm$ 0.6 (11) ^{a,b}
Urea (mg/dL)	†	14.6 $\pm$ 3.6 (29) ^{a,b}	21.0 $\pm$ 10.9 (23) ^{a,c}	35.0 $\pm$ 19.0 (13) ^{b,c}
Cn (mg/dL)	§	0.58 $\pm$ 0.21 (29) ^a	0.70 $\pm$ 0.2 (23)	0.78 $\pm$ 0.29 (12) ^a
Uric Acid (mg/dL)	§	4.3 $\pm$ 1.0 (29) ^{a,b}	5.4 $\pm$ 1.4 (23) ^{a,c}	7.6 $\pm$ 1.4 (13) ^{b,c}
i-B (mg/dL)	§	0.205 $\pm$ 0.13 (26)	0.17 $\pm$ 0.23 (16)	0.220 $\pm$ 0.480 (11)
t-B (mg/dL)	§	0.425 $\pm$ 0.19 (26)	0.28 $\pm$ 0.17 (20)	0.340 $\pm$ 0.490 (13)
Na (mEq/L)	§	138.0 $\pm$ 2.5 (24) ^a	140.0 $\pm$ 4.0 (17) ^c	136.0 $\pm$ 5.0 (13) ^{a,c}
K (mEq/L)	§	4.05 $\pm$ 0.42 (25) ^a	4.0 $\pm$ 0.5 (17)	4.56 $\pm$ 0.47 (13) ^a
Fe (mg/dL)	†	78.0 $\pm$ 46.0 (27) ^a	84.9 $\pm$ 46.1 (20) ^b	106.5 $\pm$ 89.3 (12) ^{a,b}
Ferritin (ng/mL)	§	26.5 $\pm$ 14.64 (25) ^a	31.5 $\pm$ 32.5 (17) ^b	156.2 $\pm$ 244.7 (12) ^{a,b}
RI	§	0.78 $\pm$ 0.04 (26) ^{a,b}	0.73 $\pm$ 0.09 (17) ^a	0.63 $\pm$ 0.08 (10) ^b
PI	§	1.96 $\pm$ 0.44 (26) ^{a,b}	1.62 $\pm$ 0.46 (17) ^a	1.14 $\pm$ 0.87 (10) ^b
PSV (cm/seg)	§	31.4 $\pm$ 7.4 (27)	30.6 $\pm$ 9.8 (17)	30.0 $\pm$ 15.0 (10)
P2 (cm/seg)	§	17.9 $\pm$ 10.7 (27) ^a	22.3 $\pm$ 4.1 (17)	25.3 $\pm$ 14.2 (10) ^a
PR	§	0.58 $\pm$ 0.13 (27) ^{a,b}	0.71 $\pm$ 0.27 (17) ^a	0.85 $\pm$ 0.19 (10) ^b
V _{mean} (cm/seg)	†	12.5 $\pm$ 4.9 (26)	13.3 $\pm$ 4.8 (15)	16.2 $\pm$ 7.1 (7)
EDV (cm/seg)	§	7.1 $\pm$ 3.7 (27)	8.2 $\pm$ 3.2 (17)	10.8 $\pm$ 5.4 (9)
A _{min} (ΔOD)	§	1.060 $\pm$ 0.148 (26)	1.032 $\pm$ 0.237 (22)	0.099 $\pm$ 0.074 (11)
A _{max} (ΔOD)	§	0.019 $\pm$ 0.021 (26)	0.019 $\pm$ 0.032 (22)	0.009 $\pm$ 0.009 (11)
H ₀ (g/dL NaCl)	†	0.480 $\pm$ 0.031 (26) ^d	0.472 $\pm$ 0.048 (22)	0.458 $\pm$ 0.028 (11) ^d

H ₅₀ (g/dL NaCl)	§	0.447 ± 0.036 (26) ^a	0.437 ± 0.037 (22) ^d	0.417 ± 0.028 (11) ^{a,d}
H ₁₀₀ (g/dL NaCl)	§	0.423 ± 0.030 (26) ^a	0.402 ± 0.034 (22) ^d	0.388 ± 0.013 (11) ^{a,d}
1/H ₅₀ (g/dL NaCl) ⁻¹	§	2.236 ± 0.177 (26) ^a	2.283 ± 0.201 (22) ^d	2.400 ± 0.161 (11) ^{a,d}
dX (g/dL NaCl)	§	0.017 ± 0.027 (26)	0.015 ± 0.007 (22)	0.016 ± 0.010 (11)
dX/H ₅₀	§	0.038 ± 0.208 (26)	0.035 ± 0.018 (22)	0.038 ± 0.022 (11)
dX/A _{min}	§	0.016 ± 0.007 (26)	0.014 ± 0.011 (22)	0.018 ± 0.011 (11)

^{a,b,c} and ^d indicate statistically significant ($p < 0.05$) and borderline differences ($0.05 < p < 0.10$), respectively, when present as pairs of common letters and comparisons were done by Kruskal-Wallis with Dunn-Bonferroni post-hoc test (non-normally distributed data)*[§] or ANOVA with Bonferroni post-hoc test (normally distributed data)†.

Abbreviations: N, number of participants; SPB, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; Ht, hematocrit; Hb, hemoglobin; RBC, erythrocytes; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width ; Rtc Index, reticulocytes index; Plt, platelets; MPV, mean platelet volume; t-C, total cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; VLDL-C, very low density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; TGC, triglycerides; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; HSA, human serum albumin; Cn, creatinine; iB, indirect bilirubin; tB, total bilirubin; Na⁺, sodium; K⁺, potassium;; Fe, serum iron; RI, resistance index; PI, pulsatility index; PSV, peak systolic velocity; P2, second peak of systolic velocity; PR, peak ratio; V_{mean}, mean velocity; EDV, end diastolic velocity; A_{min}, absorbance at 540 nm associated with residual lysis of the erythrocytes population; A_{max}, absorbance at 540 nm associated with lysis of the whole population of erythrocytes; H₀, saline concentration where *in vitro* hemolysis begins; H₅₀, saline concentration capable of promoting 50% hemolysis, H₁₀₀, saline concentration where *in vitro* lysis ends; 1/H₅₀, inverse the NaCl concentration capable of promoting 50% hemolysis; dX, variation in the concentration of NaCl responsible for total hemolysis.

Table 2.2. Values of Spearman σ coefficients for the correlations between all pairs of variables in the group of normotensive pregnant women*

Variable	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47								
1 Weight Gain	1.0																																																						
2 BMI	0.4	1.0																																																					
3 Gestacional Age	-0.1	0.1	1.0																																																				
4 Birth Weight	0.1	-0.1	0.2	1.0																																																			
5 Placenta Weight	0.2	0.0	0.2	0.2	1.0																																																		
6 SBP	0.3	-0.1	0.1	0.1	0.1	1.0																																																	
7 DBP	0.1	0.0	0.3	0.0	0.2	0.5	1.0																																																
8 RBC	0.1	0.3	0.0	-0.1	-0.3	-0.3	-0.1	1.0																																															
9 Hb	-0.1	0.0	0.2	-0.1	-0.4	0.1	0.0	0.5	1.0																																														
10 Ht	0.1	0.2	0.1	-0.1	-0.5	0.0	-0.1	0.7	0.9	1.0																																													
11 MCH	0.0	0.0	0.1	-0.1	-0.1	0.5	0.1	-0.5	0.4	0.2	1.0																																												
12 MCV	0.0	-0.1	0.2	0.0	-0.1	0.5	0.1	-0.5	0.5	0.2	0.9	1.0																																											
13 MCHC	-0.3	-0.4	0.0	-0.2	0.1	0.3	0.2	-0.4	0.3	0.0	0.6	0.3	1.0																																										
14 RDW	0.2	0.2	0.0	0.2	0.3	-0.3	-0.1	0.2	-0.5	-0.2	-0.6	-0.5	-0.6	1.0																																									
15 Rtc	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-0.1	-0.2	0.0	-0.5	-0.4	-0.4	-0.4	-0.4	0.1	1.0																																								
16 Ptt	-0.2	0.1	0.4	0.1	-0.2	-0.1	-0.3	0.3	0.6	0.6	0.2	0.3	0.0	-0.3	-0.2	1.0																																							
17 MPV	-0.1	0.0	-0.3	-0.2	0.1	0.1	0.2	-0.3	-0.2	-0.2	0.0	-0.1	0.3	0.2	-0.3	-0.5	1.0																																						
18 tC	0.0	-0.2	0.0	-0.2	0.3	0.1	0.3	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	-0.2	0.0	0.0	-0.1	1.0																																						
19 TGC	0.0	-0.1	0.3	0.3	0.6	0.1	0.1	-0.3	-0.1	-0.2	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	1.0																																				
20 HDL-C	0.3	0.3	0.1	0.1	-0.2	0.1	0.1	0.5	0.3	0.5	-0.2	0.1	-0.4	0.2	0.0	0.1	-0.4	0.1	-0.1	1.0																																			
21 LDL-C	-0.2	-0.3	-0.2	-0.3	0.2	0.0	0.2	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.2	-0.2	0.0	-0.1	0.1	0.9	0.2	-0.2	1.0																																		
22 VLDL-C	0.1	-0.1	0.3	0.3	0.6	0.2	0.2	-0.3	-0.1	-0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.4	1.0	-0.2	0.2	1.0																																	
23 ALT	0.1	-0.1	-0.2	0.0	0.1	0.2	-0.1	-0.3	0.0	-0.1	0.4	0.3	0.2	-0.1	-0.1	0.0	0.1	0.3	0.3	-0.1	0.3	0.4	1.0																																
24 AST	-0.1	0.1	-0.2	-0.1	-0.1	-0.1	-0.1	0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.0	-0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	-0.2	0.2	0.2	0.4	1.0																															
25 LDH	0.1	0.1	-0.2	-0.2	0.1	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1	-0.1	0.0	0.0	-0.2	0.3	-0.2	0.3	0.3	-0.1	0.6	-0.1	1.0																														
26 Urea	0.0	0.3	0.1	-0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.3	0.3	0.4	0.0	0.2	-0.2	0.1	-0.2	0.1	0.0	0.3	0.0	0.5	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1	1.0																													
27 Cn	0.1	0.2	0.0	0.2	-0.1	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	-0.1	-0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	-0.1	0.2	-0.2	0.3	1.0																									
28 UA	0.4	0.2	0.3	0.0	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.2	0.4	-0.3	0.2	-0.1	-0.1	-0.1	0.3	0.0	1.0																											
29 iB	0.2	-0.1	-0.3	0.0	-0.3	0.2	-0.1	-0.2	0.4	0.2	0.5	0.5	0.3	-0.4	-0.1	0.1	-0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.3	0.3	0.0	0.2	0.2	0.0	1.0																										
30 tB	0.1	-0.1	-0.2	0.0	-0.3	0.4	0.0	-0.3	0.5	0.3	0.7	0.7	0.4	-0.5	-0.3	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	-0.1	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.8	1.0																										
31 Fe	-0.1	0.2	0.3	-0.1	-0.3	0.2	0.1	-0.1	0.2	0.1	0.3	0.3	0.3	-0.2	-0.2	0.0	0.0	-0.2	0.0	0.3	-0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	1.0																									
32 Ferritin	-0.1	0.3	0.3	0.1	-0.1	-0.2	0.0	0.1	0.3	0.2	0.3	0.1	0.3	-0.1	-0.3	0.4	0.0	-0.4	0.1	-0.2	-0.5	0.1	0.2	0.5	-0.1	-0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.4	1.0																							
33 RI	0.0	-0.2	-0.2	0.1	-0.2	0.2	0.1	-0.3	-0.2	-0.2	0.0	0.1	-0.1	0.0	-0.2	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.1	-0.1	0.0	0.1	-0.1	0.0	-0.2	0.0	-0.3	-0.1	0.3	-0.3	0.4	0.3	0.0	-0.2	1.0																			
34 PI	0.0	-0.3	-0.2	0.1	0.0	0.1	0.1	-0.2	-0.2	-0.2	-0.2	-0.2	-0.2	-0.2	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	-0.2	0.1	0.0	-0.4	-0.1	-0.3	-0.2	0.4	-0.3	0.3	0.2	-0.2	-0.3	0.6	1.0																					
35 PSV	-0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	-0.2	0.0	-0.2	-0.1	-0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	-0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	-0.1	0.2	0.2	-0.1	0.0	0.1	0.6	-0.3	-0.3	1.0																				
36 P2	0.0	0.4	0.1	0.1	0.2	-0.2	-0.1	-0.2	0.0	0.0	0.5	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.2	0.0	-0.1	0.2	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.3	0.2	0.1	0.3	0.6	-0.3	-0.6	0.8	1.0																			
37 PR	0.3	0.3	0.2	-0.1	0.2	-0.1	-0.1	0.0	0.3	0.2	0.4	0.4	-0.2	-0.1	0.0	0.3	-0.3	0.4	0.3	0.2	0.3	0.3	0.6	0.2	0.3	0.4	-0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	-0.4	-0.7	0.2	0.6	1.0																		
38 Vmean	-0.1	0.4	0.2	0.0	0.3	-0.2	0.0	-0.2	-0.1	-0.1	0.3	0.2	-0.1	0.2	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	-0.1	-0.1	0.3	0.4	0.1	0.1	0.2	0.0	0.3	0.0	-0.2	0.2	0.5	-0.4	-0.6	0.7	0.9	0.6	1.0																	
39 EDV	-0.1	0.3	0.2	0.1	0.3	-0.1	-0.1	-0.1	-0.1	-0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	-0.1	0.1	-0.1	0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.5	0.2	0.4	0.0	-0.2	0.2	-0.2	-0.1	0.2	0.5	-0.7	-0.7	0.7	0.8	0.4	0.8	1.0																
40 Amin	-0.1	-0.2	-0.2	0.1	-0																																																		

Table 2.4. Values of Spearman σ coefficients for the correlations between all pairs of variables in the group of pregnant women with early-onset preeclampsia (EOPE)*

*Gray boxes indicate values of $p \leq 0.05$.

Fig 2.1

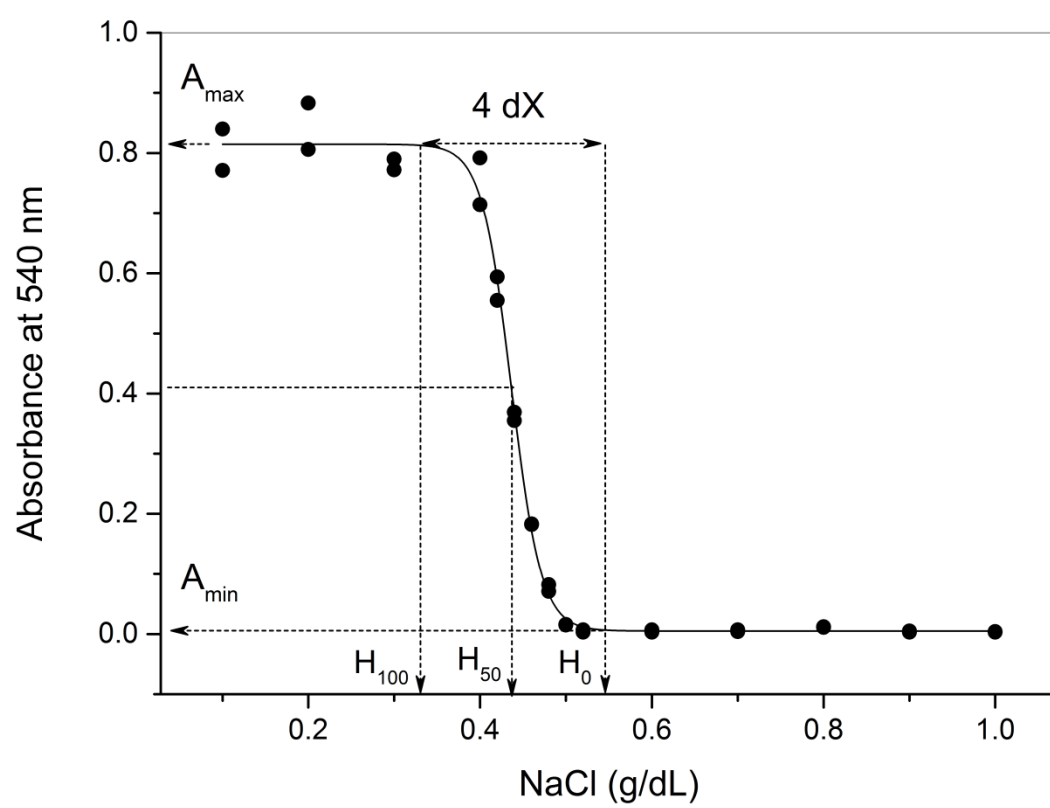


Fig 2.2

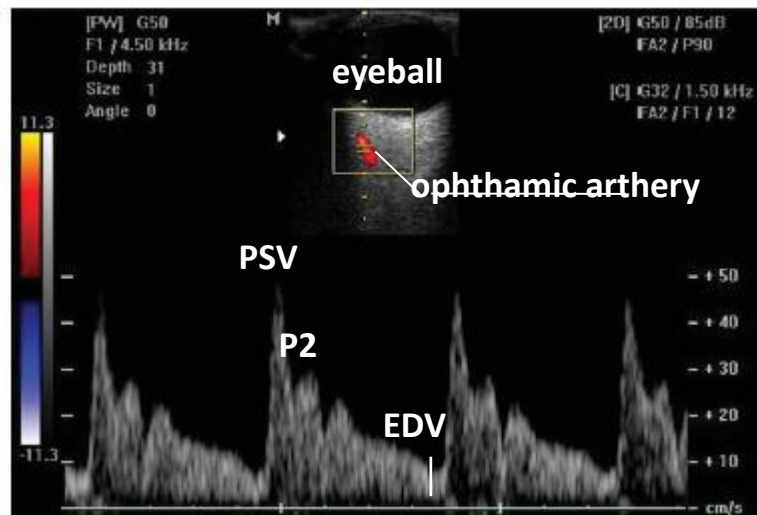
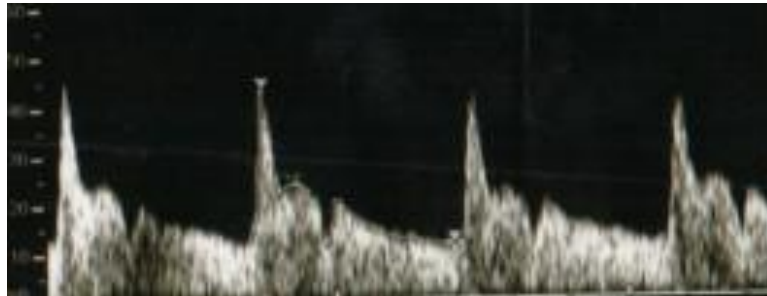
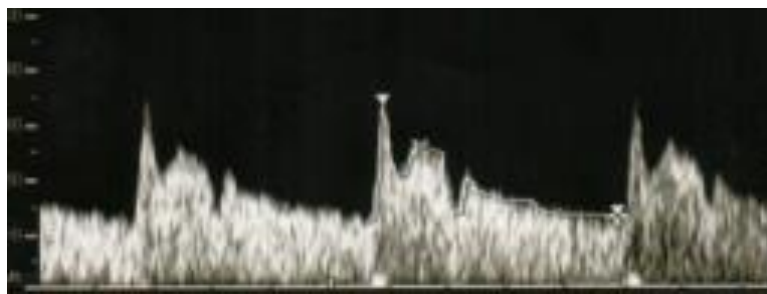


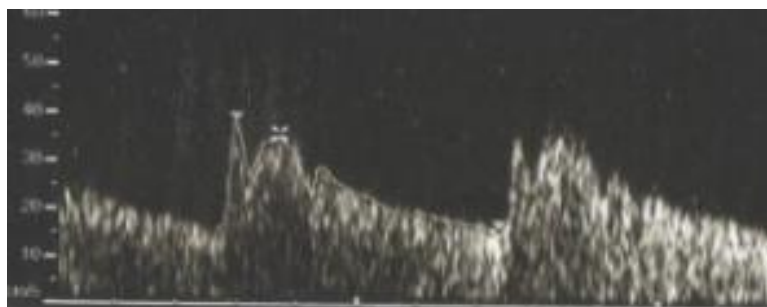
Fig 2.3



(a)

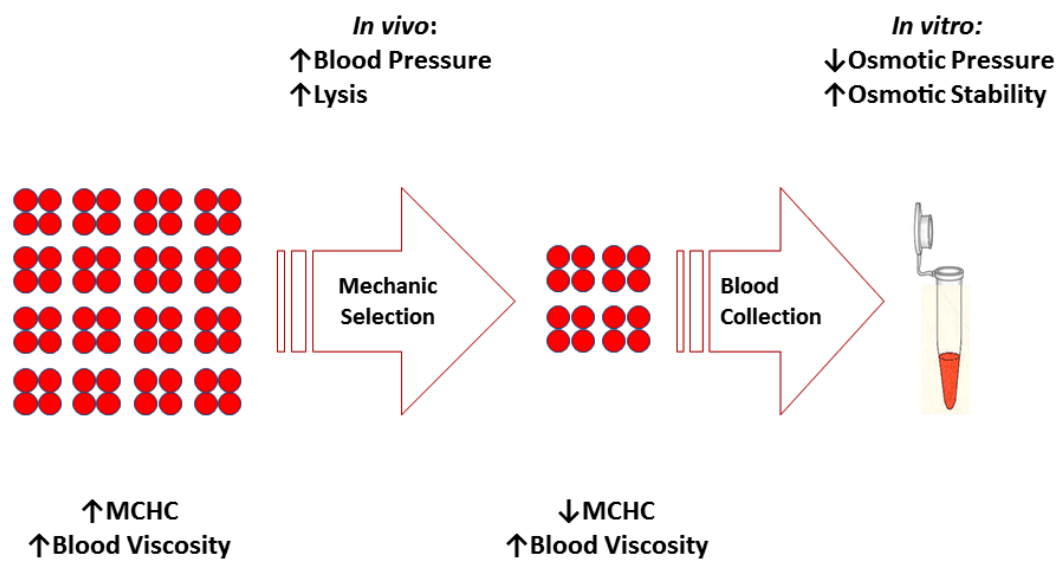


(b)



(c)

Fig 2.4



Capítulo 3

The role of the erythrocyte in the outcome of pregnancy with preeclampsia

Márcia Aires Rodrigues de Freitas^{1,2}, Alice Vieira da Costa², Luciana Alves de Medeiros², Lucas Moreira Cunha¹, Ubirajara Coutinho Filho³, Mario da Silva Garrote Filho², Angélica Lemos Debs Diniz¹, Nilson Penha-Silva²

¹Faculty of Medicine, ²Institute of Genetics and Biochemistry and ³Faculty of Chemical Engineering of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

Resumo

[O papel do eritrócito no desfecho da gravidez com pré-eclâmpsia]

Este estudo teve como objetivo avaliar as relações de variáveis antropométricas, hemodinâmicas, hematimétricas e bioquímicas com a estabilidade osmótica e a cinética de lise mecânica de eritrócitos em 15 voluntários com pré-eclâmpsia. Os resultados mostraram que na pré-eclâmpsia os eritrócitos com menores volumes e com níveis mais baixos de hemoglobina favorecem a ocorrência de um melhor resultado gestacional, porque são mais estáveis e estão associados a uma diminuição das alterações hemodinâmicas presentes na doença. Isso deve significar que a existência de microcitose, provavelmente em decorrência de um mecanismo de seleção mecânica compensatória, é uma característica desejável na doença. Em vista disso, esses resultados sugerem que a suplementação de ferro, recomendada durante a gravidez, deva ser melhor estudada para identificar possíveis danos à gravidez na pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia; Hemograma; Lipidograma; Eritrócitos; Estabilidade osmótica; Lise mecânica

Abstract

[The role of the erythrocyte in the outcome of pregnancy with preeclampsia]

This study aimed to evaluate the relationships of anthropometric, hemodynamic, hematimetric and biochemical variables with the osmotic stability and mechanical lysis kinetics of erythrocytes in 15 volunteers with preeclampsia. The results showed that in preeclampsia, erythrocytes with lower volumes and lower levels of hemoglobin favor the occurrence of a better gestational outcome, because they are more stable and because they are associated with a decrease in the hemodynamic changes present in the disease. This should mean that the existence of microcytosis, due to a mechanism of compensatory mechanical selection, is a desirable characteristic in the disease. In view of this, these results suggest that supplementation of iron recommended during pregnancy should be further studied in order to identify possible damages to the pregnancy in pre-eclampsia.

Keywords: Preeclampsia; Hemogram; Lipidogram; Erythrocytes; Osmotic stability; Mechanical lysis

Introduction

Pre-eclampsia (PE) is a complex systemic syndrome that occurs after the 20th week of gestation (Henderson et al., 2017) and is characterized by the occurrence of hypertension and/or proteinuria and/or organ dysfunction in previously normotensive woman (American College of, Gynecologists, & Task Force on Hypertension in, 2013). PE is one of the leading causes of maternal and fetal morbidity and mortality in developing countries (Abalos, Cuesta, Grosso, Chou, & Say, 2013; Duley, 2009; Say et al., 2014).

Pregnant women with PE present low placental perfusion and a set of generalized changes affecting several organs and systems (Gupte & Wagh, 2014).

The occurrence of placental hypoxia or placental ischemia with diffuse oxidative endothelial aggression (Powe, Levine, & Karumanchi, 2011) by reactive oxygen species (Sanchez-Aranguren, Prada, Riano-Medina, & Lopez, 2014), resulting in systemic vasoconstriction, elevation of blood pressure levels and multiple organ dysfunctions, is believed to be the common pathway of all forms of preeclampsia (Bell, 2010; Burton & Jauniaux, 2004; Chen, Masaki, & Sawamura, 2002; Gilbert et al., 2008), although the etiology has not yet been fully elucidated.

The endothelium - by internally lining the blood vessels - is always in contact with the erythrocytes. In pre-eclampsia, several studies have already shown alterations in the production, morphology and membrane fragility of erythrocytes (Catarino et al., 2009; Hernandez Hernandez et al., 2015; Spickett et al., 1998). However, there is still no description of how maternal erythrocytes participate in the etiopathogenesis of the disease (Abad et al., 2010).

Due to their own function, erythrocytes have a high concentration of iron and oxygen, which makes them very vulnerable to oxidative stress (Abad et al., 2010; Spickett et al., 1998). In addition, the erythrocyte membrane has a high content of phospholipids composed of polyunsaturated fatty acids, which makes it very susceptible to lipoperoxidation (Abad et al., 2010). The content of unsaturated fatty acids (of their phospholipids) in relation to the membrane cholesterol content is essential for maintaining the fluidity, deformability and stability of erythrocytes (Bernardino Neto et al., 2013; Chabanel et al., 1983; de Freitas et al., 2014). Lipoperoxidation alters this proportion of lipids and impairs the fluidity, deformability and stability of erythrocytes. The result of this is the increase in lysis rate of these cells. This lysis leads to the release of iron, which participates in processes that give rise to the formation of superoxide ($O_2^{\bullet}$) and hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$), initiating a cascade of oxidative damage (Spickett et al., 1998) which is certainly present in the etiopathogenesis of preeclampsia.

The relative cholesterol content in the erythrocyte membrane is also essential in determining membrane fluidity, deformability and stability (Chabanel et al., 1983; Cooper, Arner, Wiley, & Shattil, 1975; da Silva Garrote-Filho, Bernardino-Neto, & Penha-Silva, 2017). In turn, this relative content of membrane cholesterol is dependent on cholesterol levels of plasma lipoproteins (Cooper et al., 1975). As the occurrence of dyslipidemia, which is a condition considered normal in pregnancy (Brizzi et al., 1999), is exacerbated in preeclampsia (Jarvie et al., 2010; Spracklen, Smith, Saftlas, Robinson, & Ryckman, 2014), it is possible that the erythrocyte behavior is also associated with lipidemia in this pathological condition.

Despite its importance, few studies have evaluated the membrane stability of erythrocytes in pregnant women with pre-eclampsia, which could help to better understand the mechanisms associated with this syndrome. Therefore, the objective of this study was to evaluate the relationships between osmotic and mechanical stability of erythrocytes with hematological, biochemical and hemodynamic variables in a population of pregnant women with pre-eclampsia.

Material and Methods

Population and Ethics

The cross-sectional study presented here was previously approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia and registered under number 23236614.4.000.5152.

The study included 15 pregnant women with preeclampsia admitted to the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia from December 2014 to June 2017. All participants signed a free and informed consent form. The diagnosis of pre-eclampsia was defined according to the 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; 122:1122).

The pregnant women took preventive supplementation of folic acid (5 mg/day) in the first trimester of gestation and ferrous sulfate (200 mg/day) in the second and third trimesters of pregnancy.

Pregnant women with thyroid diseases, erythrocytopathies, chronic hypertension, autoimmune diseases, diabetes, kidney diseases and current use of anticonvulsants, antidepressants, tobacco, alcohol and/or drugs of abuse, and patients with gestations associated with congenital infections (toxoplasma and cytomegalovirus), twinning, fetal malformation and natimortality were excluded from the study.

Blood collection

Blood samples (4 mL) were collected by intravenous puncture in two tubes (Vacutainer; Becton Dickinson, Juiz de Fora, Brazil) containing K₃EDTA (for hematological analysis and determination of osmotic and mechanical fragility of erythrocytes) and in one tube without anticoagulant (for biochemical analyzes).

Determination of the osmotic stability of erythrocytes

A duplicate series of test mini-tubes containing 1 mL of 0.1-1.5 g/dL NaCl solution (Labsynth, Diadema, SP, Brazil) was preincubated for 10 minutes in a thermostated bath at 37 °C (Marconi, model MA 184, Piracicaba, SP, Brazil). After adding 20 µL of whole blood, the tubes were homogenised and again incubated at 37 °C for 30 minutes. The tubes were then centrifuged at 1500 x g (Hitachi Koki™, model CFR15XRII, Hitachinaka, Japan) for 10 minutes. Supernatants from all tubes were removed and analyzed on a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu™, model UV1650TC, Japan) to estimate the amount of hemoglobin released in lysis of erythrocytes.

The graphs of A₅₄₀ as a function of the NaCl (X) concentration were adjusted by sigmoidal nonlinear regression, according to the Boltzmann equation:

$$A_{540} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{\min} \quad (1),$$

where A_{max} and A_{min} represent respectively the maximum and minimum plateaus of A₅₄₀, H₅₀ is the concentration of NaCl capable of promoting 50% hemolysis and dX represents one-fourth of the variation in NaCl concentration responsible for promoting 100% hemolysis (Bernardino Neto et al., 2013; Mascarenhas Netto Rde et al., 2014). The saline concentration at the initial point of the curve defines the variable H₀, which is the saline concentration required to initiate in vitro hemolysis, and can be calculated by the formula H₀ = H₅₀ + 4dX/2. The saline concentration at the point where the in vitro lysis reaches its maximum plateau

defines the variable H_{100} , which represents the saline concentration necessary to promote total lysis of the red blood cells, being calculated by the formula $H_{100} = H_{50} - 4dX/2$.

Mechanical lysis kinetics of erythrocytes

Volumes of 15 mL of the suspension consisting of the mixture of 250 μ L of whole blood and 49.75 mL of 0.9 g/dL NaCl solution were inserted into the equipment analysis cell and subjected to mechanical aggression promoted by a propeller under 8000 rpm for 6 minutes at room temperature. Every 30 seconds of stirring, duplicated aliquots of 1 mL suspension were removed and added to minitubes. After centrifugation at $1600 \times g$ for 10 minutes in a Hitachi Koki centrifuge (model CFR15XRII, Hitachinaka, Japan), the supernatants were subjected to absorbance readings at 540 nm (A_{540}) on a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu™, model UV1650TC, Japan) for estimation of the amount of hemoglobin released in the mechanical lysis of erythrocytes.

The graph of the absorbance at A_{540} (A) versus time (t) was adjusted to the hyperbola given by Michaelis-Menten equation:

$$A = \frac{A_{\text{mmax}} t}{t_{1/2} + t} \quad (2),$$

where A_{mmax} is the maximum plateau of A_{540} , which represents the maximum amount of hemoglobin released in the lysis of the entire erythrocyte population, and $t_{1/2}$ is the time interval necessary for promotion of 50% lysis of erythrocytes ($A_{\text{mmax}}/2$).

Doppler ultrasonography of the ophthalmic artery

The AO Doppler ultrasound was performed in Medison (SonoAce 8800MT model, Japan) equipment, by a single examiner with over 10 years of experience. The AO was insonated in the medial region of the optic nerve with linear transducer at 7-10 MHz frequency, 50 Hz filter, 5 kHz pulse repetition frequency and 7 mm sample volume (Williamson & Harris, 1996). Only one eye was examined because previous studies did not show significant differences between the eyes (Diniz et al., 2008; Matias, Costa, Matias, Gordiano, & Correia, 2012).

Determination of hematologic and biochemical parameters

An automated system (Sysmex K4500; Sysmex Corporation™, Mundelein, IL, USA) was used to obtain the hematologic parameters: red blood cell (RBC) and platelet (Plt) counts, mean platelet volume (MPV), reticulocytes index (RI), hematocrit (Ht), hemoglobin

(Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and red cell width distribution (RDW).

An automated analyzer (Architect c8000, IL, USA) was used to determine the following biochemical parameters: total cholesterol (t-C), triglycerides (TGC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol LDL-C), very-low-density lipoprotein cholesterol (LDL), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea(U), creatinine (Cn), uric acid (UA), human serum albumin (HSA), sodium (Na^+), potassium (K^+), indirect bilirubin (iB), total bilirubin (tB), serum iron (Fe) and ferritin (Ferritin).

Urine reagent tapes (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) were used to evaluate proteinuria.

Reference values described for the third trimester of gestation (Abbassi-Ghanavati, Greer, & Cunningham, 2009) were used for: RBC, $2.71\text{--}4.43 \times 10^6$ cells/ mm^3 ; Hb, 9.5–15.0 g/dL; Ht, 28.0–40.0%; MCV, 81–99 fL; MCH, 29–32 pg/cell; MCHC, 31–36 g%; RDW, 12.7–15.3%; Plt, $146\text{--}429 \times 10^3$ cells/ mm^3 ; MPV, 8.2–10.4 fL; t-C, 219–349 mg/dL; HDL-C, 48–87 mg/dL; LDL-C, 101–224 mg/dL; VLDL-C, 21–36 mg/dL; TGC, 131–453 mg/dL; U, 3–11 mg/dL; Cn, 0.4–0.9 mg/dL; UA, 3.1–6.3 mg/dL; AST, 4–32 U/L; ALT, 2–25 U/L; Na^+ , 130–148 mEq/L; K^+ , 3.3–5.1 mEq/L; LDH, 82–524 U/L; i-B, 0.1–0.5 mg/dL; t-B, < 0.1–1.1 mg/dL; Fe, 30–193 $\mu\text{g/dL}$; Ferritin, 0–116 ng/mL; HAS, 2.3–4.2 g/dL.

Statistical analysis

Data normality was evaluated by the Shapiro-Wilk test. Most of the variables did not present normal distribution and therefore the Spearman correlation analysis was used to determine the associations between the hematologic and biochemical variables. The level of significance was set at $p < 0.05$. All analyzes were performed using Origin 8.5 (Microcal, Northampton, MA, EUA) and SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL USA).

Results

Figure 3.1 shows a typical sigmoid curve obtained in the determination of erythrocyte membrane stability variables. A blood isotonicity condition occurs in the region to the right of the curve, where the value on the ordinate of the lower plateau of the curve defines the variable $A_{\min}$, which represents the amount of basal hemolysis present in the blood sample of

each volunteer in the study. The higher this A_{min} value, the lower the erythrocyte stability under osmotic conditions similar to those observed *in vivo*. Therefore, A_{min} is the osmotic stability variable that most represents the stability of erythrocytes *in vivo*. Following this curve, from right to left, as it shall be seen, the salt concentration where the lysis begins to occur defines the variable H_0 . With the decrease in saline concentration, the lysis rate will reach 50% of the maximum lysis at the intermediate point of the curve, whose value in the abscissa defines the variable H_{50} . When the lysis rate reaches its maximum point, which occurs when the curve reaches the upper plateau, the salt concentration where the lysis rate runs out defines the variable H_{100} . The variables H_0 , H_{50} and H_{100} are proportional to the osmotic fragility of the erythrocytes. Therefore, the use of their inverse forms, $1/H_0$, $1/H_{50}$ and $1/H_{100}$ is that it effectively represents the osmotic stability of those cells. The ordinate value of the upper sigmoid plateau defines the variable A_{max} , which represents the maximum possible rate of lysis of the erythrocytes of the analyzed blood sample and which therefore must show obvious associations with hemoglobin levels, erythrocyte counts and the hematocrit values of the donor of the analyzed blood sample. There is yet another primary variable defined by the mathematical model of statistical fit itself; this variable is dX , which represents a quarter of the variation in saline concentration required to promote 100% hemolysis. dX is effectively a variable of osmotic stability of erythrocytes and, therefore, the dX/H_{50} and dX/A_{min} ratios are directly proportional to the erythrocyte membrane stability, since A_{min} and H_{50} have inverse relationships with the stability of these cells.

Figure 3.2 shows a mechanical lysis curve of the erythrocyte. With increasing time under mechanical stress, erythrocytes undergo lysis and release hemoglobin, resulting in increased absorbance by 540nm. The data fit defines a hyperbolic curve whose upper plateau defines the A_{mmax} variable, which represents the absorbance associated with the amount of hemoglobin released when there is 100% lysis of the erythrocyte population. The curve passes through an intermediate point, whose abscissa value ($t_{1/2}$) represents the time required to promote 50% hemolysis. The $t_{1/2}$ variable is directly related to the mechanical stability of erythrocytes.

Figure 3.3 is a schematic representation of the variation in blood flow velocity in the ophthalmic artery (OA) as a function of the duration time of a cardiac cycle. At each ejection of blood from the left ventricle (systole), a pulse pressure occurs which is represented by a rapid upward curve, generating the Systolic Velocity Peak (PSV), which is followed by sudden drop and a secondary elevation of velocity, generating a second systolic peak (P2) and a notch (aortic notch) before the end of the systolic cycle. As the vascular diameter returns to

normal, the accumulated energy provides a potential necessary to promote continuous flow during diastole, which is represented in the graph by a new rise in velocity that is followed by slow deceleration, ending in the peak that characterizes the end-diastolic velocity (EDV).

The interpretation of the graphical representation of the OA Doppler occurs by analysis of 1) the shape of the pulse velocity wave (PWV), 2) the velocity peaks and 3) the average velocity of a cardiac cycle (V_{mean}), as well as the Pulsatility Index (PI), given by $(\text{PSV}-\text{EDV})/V_{\text{mean}}$, the Resistance Index (IR), given by $(\text{PSV}-\text{EDV})/\text{PSV}$, and the Peak Ratio (PR), given by $\text{P2}/\text{PSV}$. In pre-eclampsia, there is a specific alteration in the morphology of the wave, which acquires the shape of hump, due to the increase in amplitude and rounding of P2, indicating the presence of hyperflow in orbital territory. The elevation of PR and P2 also indicates hyperflow in orbital territory. In contrast, the decrease in IP and IR represents an increase in the flow velocity at that site.

Table 3.1 shows baseline characteristics of the population of pregnant women with PE in this study.

Table 3.2 presents the Spearman correlation matrix between each pair of variables considered in this study. Some correlations deserve special mention.

In relation to the osmotic stability variables, the strong negative correlations of dX/A_{min} and dX/H_{50} with Hb, MCV, MCH and MCHC are noteworthy.

Regarding the variables of mechanical lysis kinetics, the negative correlations of A_{max} with the Doppler velocimetric variables PSV and P2 shall be highlighted.

Regarding the hematological variables, the positive correlations of MCV with HCM, total bilirubin and iron; the negative correlations of MCV with gestational age and placental weight; and the positive correlation observed between MCH and the Dopplervelocimetric variable PR, shall be highlighted.

Regarding the biochemical variables, the negative correlations of uric acid with gestational age, birth weight and placental weight deserve attention.

Discussion

The negative correlations of the maternal serum levels of uric acid with gestational age, placental weight and birth weight emphasize the ability of the serum levels of uric acid to provide a fetal prognosis, as suggested in the literature (Cnossen et al., 2006; Thangaratnam, Ismail, Sharp, Coomarasamy, & Khan, 2006). This is very relevant because it

is related to the etiopathogenesis of the disease, since in PE the elevation of uricemia would have a placental origin, in addition to the contribution exerted by the decrease of the glomerular filtration rate (Livingston et al., 2014). It is believed that, in a situation of hypoxia, the placenta induces the production of uric acid by increasing the activity of xanthine oxidase. It is possible that this is associated with the activation of endogenous mechanisms of anti-oxidation, since uric acid is an important anti-oxidant of endogenous origin (Spickett et al., 1998). In addition to the damage associated with oxidative stress, elevated uricemia was associated with damage in the amino acid transport through the transplacental barrier, inability to invasion and remodeling of spiral arteries by trophoblasts (Livingston et al., 2014).

In pregnant women, the hyperdynamic state present in preeclampsia (Easterling & Benedetti, 1989) is responsible for a higher pulse pressure in the left ventricle and, therefore, erythrocytes with greater mechanical resistance would be spared from lysis and would adequately oxygenate the tissues.

The negative correlations of MCV and MCH with gestational age and placental weight indicate that, in preeclampsia, erythrocytes with lower volume and lower concentration of hemoglobin favor the occurrence of a better gestational outcome. The strong positive correlations of MCV with Hb and MCHC suggest that this reduction in erythrocyte volume is associated with a reduction in the hemoglobin content, with a decrease in its ability to retain water (Lurie & Mamet, 2000). On the other hand, the positive association observed between HCM and the hemodynamic index PR reveals that lower concentrations of hemoglobin were associated with lower cerebral hyperflow in the pregnant women with PE. Actually, the negative associations observed between A_{max} and the hemodynamic variables PSV and P2 also support the idea that lower levels of hemoglobin make unnecessary the occurrence of compensatory cerebral hyperflow.

This indicates that the existence of microcytosis would be a desirable feature in preeclampsia. But why? The answer to this question seems to lie in the negative associations of the stability indices dX/A_{min} and dX/H_{50} with hemoglobin, MCV and MCH. These correlations indicate that erythrocytes with lower volume and lower hemoglobin concentration were more stable in hyposmotic medium in vitro, certainly due to their greater capacity to undergo volume expansion prior the occurrence of lysis.

Larger erythrocytes with higher hemoglobin levels offer more resistance to blood flow and are more vulnerable to premature lysis when passing through small diameter capillaries, especially in the face of increased pressure (Figure 3.4). Indeed, positive correlations of MCV and MCH with total bilirubin and serum iron suggest that erythrocytes with higher vol-

ume and higher hemoglobin concentration contributed more effectively to the determination of circulating levels of total bilirubin and iron.

In summary, the results obtained in this study suggest that in pre-eclampsia the existence of microcytosis would be due to a compensatory mechanism of mechanical selection. Therefore, these results suggest that iron supplementation, recommended during pregnancy, should be better studied in pre-eclampsia, in order to identify the generation of possible harm to the pregnancy.

References

- Abad, C., Carrasco, M. J., Pinero, S., Delgado, E., Chiarello, D. I., Teppa-Garran, A., . . . Marin, R. (2010). Effect of magnesium sulfate on the osmotic fragility and lipid peroxidation of intact red blood cells from pregnant women with severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 29(1), 38-53. doi: 10.3109/10641950902777713
- Abalos, E., Cuesta, C., Grosso, A. L., Chou, D., & Say, L. (2013). Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 170(1), 1-7. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.05.005
- Abbassi-Ghanavati, M., Greer, L. G., & Cunningham, F. G. (2009). Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol*, 114(6), 1326-1331. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181c2bde8
- American College of O., Gynecologists, & Task Force on Hypertension in, P. (2013). Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*, 122(5), 1122-1131. doi: 10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88
- Bell, M. J. (2010). A historical overview of preeclampsia-eclampsia. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 39(5), 510-518. doi: 10.1111/j.1552-6909.2010.01172.x
- Bernardino Neto, M., de Avelar, E. B., Jr., Arantes, T. S., Jordao, I. A., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M., . . . Penha-Silva, N. (2013). Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology*, 50(5-6), 305-320. doi: 10.3233/bir-130641
- Brizzi, P., Tonolo, G., Esposito, F., Puddu, L., Dessole, S., Maioli, M., & Milia, S. (1999). Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 181(2), 430-434.
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2004). Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*, 11(6), 342-352. doi: 10.1016/j.jsigi.2004.03.003
- Catarino, C., Rebelo, I., Belo, L., Rocha-Pereira, P., Rocha, S., Bayer Castro, E., . . . Santos-Silva, A. (2009). Erythrocyte changes in preeclampsia: relationship between maternal and cord blood erythrocyte damage. *J Perinat Med*, 37(1), 19-27. doi: 10.1515/jpm.2009.007
- Chabanel, A., Flamm, M., Sung, K. L., Lee, M. M., Schachter, D., & Chien, S. (1983). Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophys J*, 44(2), 171-176. doi: 10.1016/s0006-3495(83)84288-x
- Chen, M., Masaki, T., & Sawamura, T. (2002). LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*, 95(1), 89-100.

- Cnossen, J. S., de Ruyter-Hanhijarvi, H., van der Post, J. A., Mol, B. W., Khan, K. S., & ter Riet, G. (2006). Accuracy of serum uric acid determination in predicting pre-eclampsia: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 85(5), 519-525.
- Cooper, R. A., Arner, E. C., Wiley, J. S., & Shattil, S. J. (1975). Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *J Clin Invest*, 55(1), 115-126. doi: 10.1172/jci107901
- da Silva Garrote-Filho, M., Bernardino-Neto, M., & Penha-Silva, N. (2017). Influence of Erythrocyte Membrane Stability in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 19(4), 17. doi: 10.1007/s11883-017-0653-2
- de Freitas, M. V., Marquez-Bernardes, L. F., de Arvelos, L. R., Paraiso, L. F., Goncalves, E. O. A. F., Mascarenhas Netto Rde, C., . . . Penha-Silva, N. (2014). Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*, 19(7), 424-430. doi: 10.1179/1607845413y.0000000145
- Diniz, A. L., Moron, A. F., dos Santos, M. C., Sass, N., Pires, C. R., & Debs, C. L. (2008). Ophthalmic artery Doppler as a measure of severe pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*, 100(3), 216-220. doi: 10.1016/j.ijgo.2007.07.013
- Duley, L. (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*, 33(3), 130-137. doi: 10.1053/j.semperi.2009.02.010
- Easterling, T. R., & Benedetti, T. J. (1989). Preeclampsia: a hyperdynamic disease model. *Am J Obstet Gynecol*, 160(6), 1447-1453.
- Gilbert, J. S., Ryan, M. J., LaMarca, B. B., Sedeek, M., Murphy, S. R., & Granger, J. P. (2008). Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(2), H541-550. doi: 10.1152/ajpheart.01113.2007
- Gupte, S., & Wagh, G. (2014). Preeclampsia-eclampsia. *J Obstet Gynaecol India*, 64(1), 4-13. doi: 10.1007/s13224-014-0502-y
- Henderson, J. T., Thompson, J. H., Burda, B. U., Cantor, A., Beil, T., & Whitlock, E. P. (2017). *Screening for Preeclampsia: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force*. Rockville (MD).
- Hernandez Hernandez, J. D., Villasenor, O. R., Del Rio Alvarado, J., Lucach, R. O., Zarate, A., Saucedo, R., & Hernandez-Valencia, M. (2015). Morphological changes of red blood cells in peripheral blood smear of patients with pregnancy-related hypertensive disorders. *Arch Med Res*, 46(6), 479-483. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.07.003
- Jarvie, E., Hauguel-de-Mouzon, S., Nelson, S. M., Sattar, N., Catalano, P. M., & Freeman, D. J. (2010). Lipotry in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clin Sci (Lond)*, 119(3), 123-129. doi: 10.1042/cs20090640

- Livingston, J. R., Payne, B., Brown, M., Roberts, J. M., Cote, A. M., Magee, L. A., & von Dadelszen, P. (2014). Uric Acid as a predictor of adverse maternal and perinatal outcomes in women hospitalized with preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can*, 36(10), 870-877. doi: 10.1016/s1701-2163(15)30435-7
- Lurie, S., & Mamet, Y. (2000). Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 93(2), 185-192.
- Mascarenhas Netto Rde, C., Fabbri, C., de Freitas, M. V., Bernardino Neto, M., Garrote-Filho, M. S., Lacerda, M. V., . . . Penha-Silva, N. (2014). Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res*, 113(3), 863-874. doi: 10.1007/s00436-013-3717-4
- Matias, D. S., Costa, R. F., Matias, B., Gordiano, L., & Correia, L. C. (2012). Ophthalmic artery Doppler velocimetric values in pregnant women at risk for preeclampsia. *J Ultrasound Med*, 31(10), 1659-1664.
- Powe, C. E., Levine, R. J., & Karumanchi, S. A. (2011). Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*, 123(24), 2856-2869. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.853127
- Sanchez-Aranguren, L. C., Prada, C. E., Riano-Medina, C. E., & Lopez, M. (2014). Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol*, 5, 372. doi: 10.3389/fphys.2014.00372
- Say, L., Chou, D., Gemmill, A., Tuncalp, O., Moller, A. B., Daniels, J., . . . Alkema, L. (2014). Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*, 2(6), e323-333. doi: 10.1016/s2214-109x(14)70227-x
- Spickett, C. M., Reglinski, J., Smith, W. E., Wilson, R., Walker, J. J., & McKillop, J. (1998). Erythrocyte glutathione balance and membrane stability during preeclampsia. *Free Radic Biol Med*, 24(6), 1049-1055.
- Spracklen, C. N., Smith, C. J., Saftlas, A. F., Robinson, J. G., & Ryckman, K. K. (2014). Maternal hyperlipidemia and the risk of preeclampsia: a meta-analysis. *Am J Epidemiol*, 180(4), 346-358. doi: 10.1093/aje/kwu145
- Thangaratinam, S., Ismail, K. M., Sharp, S., Coomarasamy, A., & Khan, K. S. (2006). Accuracy of serum uric acid in predicting complications of pre-eclampsia: a systematic review. *Bjog*, 113(4), 369-378. doi: 10.1111/j.1471-0528.2006.00908.x
- Williamson, T. H., & Harris, A. (1996). Color Doppler ultrasound imaging of the eye and orbit. *Surv Ophthalmol*, 40(4), 255-267.

Legends of Figures

Fig 3.1. Typical curve of hyposmotic lysis of erythrocytes, with definition of the osmotic stability variables A_{mim} , A_{max} , H_0 , H_{50} , H_{100} , and dX .

Fig 3.2. Typical curve obtained in the kinetics of erythrocyte lysis, with definition of the kinetic variables $t_{1/2}$ and A_{mmax} .

Fig 3.3. Doppler velocimetry of the ophthalmic artery of a pregnant woman with preeclampsia. The Y axis represents the flow velocity (cm/s) and the X axis represents time (seconds). A rapid increase in velocity, with formation of the peak systolic velocity (PSV), is followed by a rapid fall and a new velocity rise, with the formation of the second systolic peak (P2), followed by the aortic notch, which closes the systolic cycle. The subsequent rise of velocity constitutes the diastolic phase of the pulse wave velocity (PWV), which ends with the end-diastolic velocity (EDV). In severe preeclampsia there is an increase in the amplitude of P2, characterizing the presence of a hump.

Fig 3.4. Illustration of aggregation of erythrocytes with larger volumes in the bloodstream of women with pre-eclampsia.

Table 3.1. Baseline characteristics of the study population

Parameters	N	Min	Q1	Median	Q3	Maximum	IQR
Age (y)	15	13	20	26	35	37	15
Weight Gain (kg)	8	7	14.375	15.5	20	25	5.63
Body Mass Index (kg/m ²)	12	25.7	30.315	32.00	36.20	41.53	5.89
Gestacional Age (w)	12	25.5	33.5	37.25	38.5	40.5	5
Birth Weight (kg)	14	475	2145	2895	3280	4430	1135
Placenta Weight (g)	15	120	415	485	585	820	170
SBP (mmHg)	15	130	140	160	170	180	30
DBP (mmHg)	15	90	90	100	110	120	20
RBC (10 ⁶ cells/mm ³)	14	3.5	3.7	4.25	4.4	4.65	0.7
Ht (%)	14	29.4	32	33.05	38	41.5	6
Hb (g/dL)	14	9	10.7	11.25	12.8	14.3	2.1
MCV (fL)	14	69.5	80.2	82.8	89.4	93	9.2
MCH (pg)	14	21.3	26.8	27.7	30.8	32.6	4
MCHC (g/dL)	14	30.6	32.7	33.85	34.5	35.3	1.8
RDW (%)	14	12	12.8	13.8	14.9	17.4	2.1
Rtc Index (%)	14	0.4	0.8	1.4	2.9	4.5	2.1
Plt (10 ³ cells/mm ³)	14	100	158	219	260	315	102
MPV (fL)	14	6.57	10.1	10.55	12	13.6	1.9
t-C (mg/dL)	14	56.8	184	208.2	233	383.2	49
HDL- C (mg/dL)	15	37.7	55.3	62	70.7	100	15.4
VLDL (mg/dL)	12	16	32.5	39.5	46.5	54	14
TGC (mg/dL)	14	80	170.8	202.65	255.8	479	85
LDL-C (mg/dL)	12	47	95.05	107	133.5	225	38.45
Proteinuria (+)	10	0	0	1	2	3	2
ALT (U/L)	15	13.9	16.1	20	27	149.6	10.9
AST (U/L)	15	7	12	12.7	20	113.7	8
LDH (U/L)	15	184	214	243	375	685	161
Urea (mg/ dL)	15	12	19	25	31.7	55	12.7
Cn (mg/ dL)	15	0.51	0.62	0.74	0.86	1.17	0.24
Uric Acid (mg/ dL)	15	4.2	5.04	5.8	7.6	9.7	2.56
Na (mEq/L)	11	132	136	138	140	140	4
K (mEq/L)	11	3.74	4.03	4.36	4.56	4.9	0.53
i-B (mg/dL)	10	0.08	0.11	0.19	0.3	0.44	0.19
t-B (mg/dL)	13	0.2	0.24	0.36	0.51	0.7	0.27
Fe (mg/dL)	14	36	58	87.025	121.1	166	63.1
Ferritin (ng/mL)	14	9.02	27.76	43.44	106.3	531.9	78.54
HSA (g/dL)	11	2.8	2.96	3.2	3.36	3.68	0.4
PSV (cm/seg)	12	18.77	25.77	29.40	39.79	48.63	14.02
P2 (cm/seg)	12	17.6	20.01	23.43	24.77	34.26	4.76
V _{mean} (cm/seg)	12	9.95	12.705	14.23	17.54	22.59	4.84
EDV (cm/seg)	11	6.81	6.97	9.63	10.4	14.35	3.43
RI	12	0.59	0.64	0.71	0.765	0.8	0.13
PI	12	1.1	1.155	1.41	1.81	2.15	0.66
PR	12	0.5	0.685	0.75	0.885	0.93	0.2
A _{min} (ΔOD)	15	0.45095	0.90413	1.01874	1.12378	1.29222	0.21965
A _{max} (ΔOD)	15	-0.00144	0.00494	0.01299	0.02248	0.04366	0.01754
H ₀ (g/dL NaCl)	15	0.42213	0.4534	0.4734	0.49455	0.50793	0.04115
H ₅₀ (g/dL NaCl)	15	0.31724	0.41369	0.43624	0.4552	0.48249	0.04151
1/H ₅₀ (g/dL NaCl) ⁻¹	15	2.07258	2.19684	2.29232	2.41727	3.15219	0.22043

H ₁₀₀ (g/dL NaCl)	15	0.16516	0.381	0.39452	0.4174	0.45705	0.0364
dX (g/dL NaCl)	15	0.00719	0.01122	0.01876	0.02341	0.07604	0.01219
dX/H ₅₀	15	0.01738	0.02494	0.04152	0.05379	0.23969	0.02885
dX/A _{min}	15	0.00674	0.00984	0.01682	0.02589	0.16862	0.01605
A _{mmax}	14	0.3439	0.53225	0.59553	0.67252	0.82524	0.14027
t _{1/2}	14	0.71592	1.00988	1.43013	2.65452	4.63747	1.64464

Variables	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54		
1 Age	.10																																																							
2 Body Mass Index	-.01	.10																																																						
3 Gestacional Age	-.03	.06	.10																																																					
4 Birth Weight	-.02	.04	.08	.10																																																				
5 Placenta Weight	-.01	.05	.08	.06	.10																																																			
6 Ap1	-.02	.00	.03	.05	.03	.10																																																		
7 Ap5	-.02	.03	.04	.06	.04	.07	.10																																																	
8 SBP	.02	-.01	-.01	-.01	-.02	-.07	-.06	.10																																																
9 DBP	.04	-.02	-.03	-.04	-.04	-.08	-.08	.09	.10																																															
10 RBC	.03	-.01	.03	.00	.00	-.05	-.07	.04	.04	.10																																														
11 Ht	.03	-.01	.00	-.02	-.04	-.03	-.06	.03	.04	.08	.10																																													
12 Hb	.02	-.05	-.03	-.04	-.03	.00	-.04	.01	.04	.08	.05	.10																																												
13 MCV	.02	-.05	-.07	-.04	-.06	.03	.00	-.02	.00	-.02	.04	.06	.10																																											
14 MCH	.01	-.05	-.06	-.03	-.06	.04	.01	-.01	.00	-.04	.02	.06	.09	.10																																										
15 MCHC	.00	-.04	-.04	-.03	-.05	.06	.02	-.02	-.01	-.04	.00	.05	.07	.09	.10																																									

51	H0	00	04	05	07	03	06	06	-02	-03	-02	-03	-05	-01	00	01	00	-03	05	03	01	-04	01	01	01	04	-02	-01	-01	-02	-04	05	-01	00	-01	00	-04	-03	02	02	02	-03	-05	00	-05	01	-01	09	-03	03	03	10					
52	H100	01	-01	-03	02	-03	07	04	-03	-02	-04	00	03	07	08	07	-04	-05	-01	07	01	-01	-01	01	-01	05	-03	-02	00	02	00	-03	-03	01	02	03	01	01	-01	00	-01	-06	-05	05	-07	08	04	08	-06	-06	-06	04	10				
53	Ammax	-01	00	-01	01	-01	02	01	-01	00	-02	00	01	04	03	02	-05	-05	01	05	00	00	-01	-01	-02	02	-04	-04	-03	00	-01	00	-01	-03	-03	-02	-03	00	00	-02	-01	-06	-08	03	-04	06	01	05	-06	-03	-04	02	06	10			
54	t1/2	05	-03	-02	-02	-01	-01	-02	02	04	02	04	05	03	04	03	-02	-04	01	00	01	04	-02	02	01	-05	03	-01	-03	00	-02	-05	00	01	04	03	02	00	01	-02	-02	-04	-04	05	-03	02	02	01	-02	-04	-03	-01	02	03	10		

*Gray Boxes indicates values of $p < 0.05$

Abbreviations: N, number of participants; SPB, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; Ht, hematocrit; Hb, hemoglobin; RBC, erythrocytes; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width ; Rtc Index, reticulocytes index; Plt, platelets; MPV, mean platelet volume; t-C, total cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; VLDL-C, very low density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; TGC, triglycerides; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; HSA, human serum albumin; Cn, creatinine; iB, indirect bilirubin; tB, total bilirubin; Na^+ , sodium; K^+ , potassium;; Fe, serum iron; RI, resistance index; PI, pulsatility index; PSV, peak systolic velocity; P2, second peak of systolic velocity; PR, peak ratio; V_{mean} , mean velocity; EDV, end diastolic velocity; A_{min} , absorbance at 540 nm associated with residual lysis of the erythrocytes population; A_{max} , absorbance at 540 nm associated with lysis of the whole population of erythrocytes; H_0 , saline concentration where *in vitro* hemolysis begins; H_{50} , saline concentration capable of promoting 50% hemolysis, H_{100} , saline concentration where *in vitro* lysis ends; $1/H_{50}$, inverse the NaCl concentration capable of promoting 50% hemolysis; dX, variation in the concentration of NaCl responsible for total hemolysis.

Figure 3.1

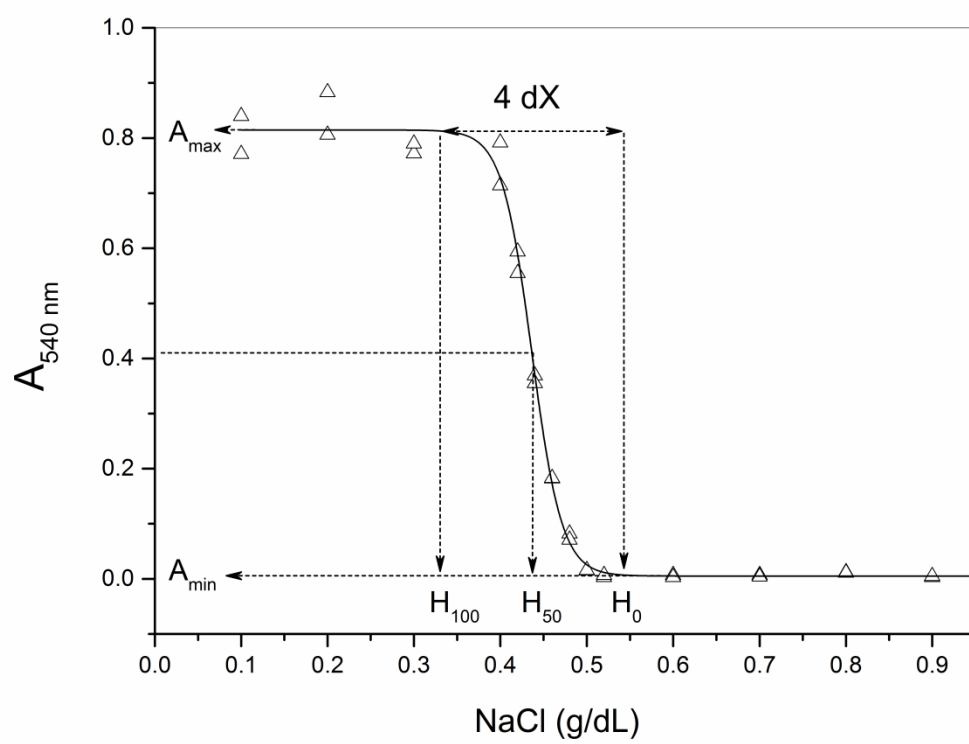


Figure 3.2

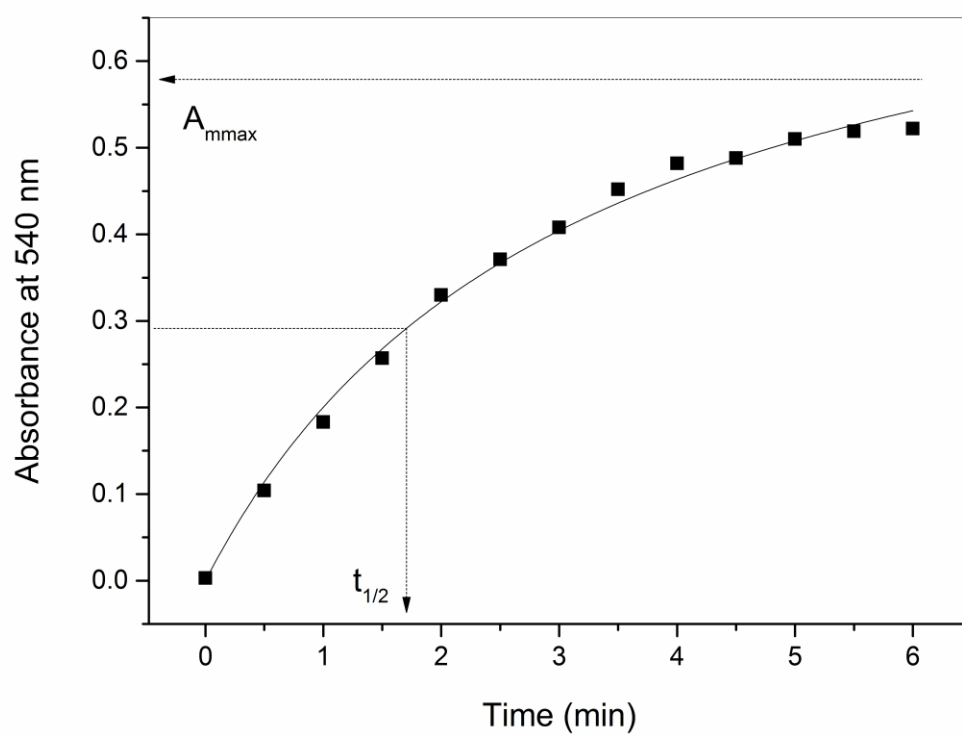


Figure 3.3

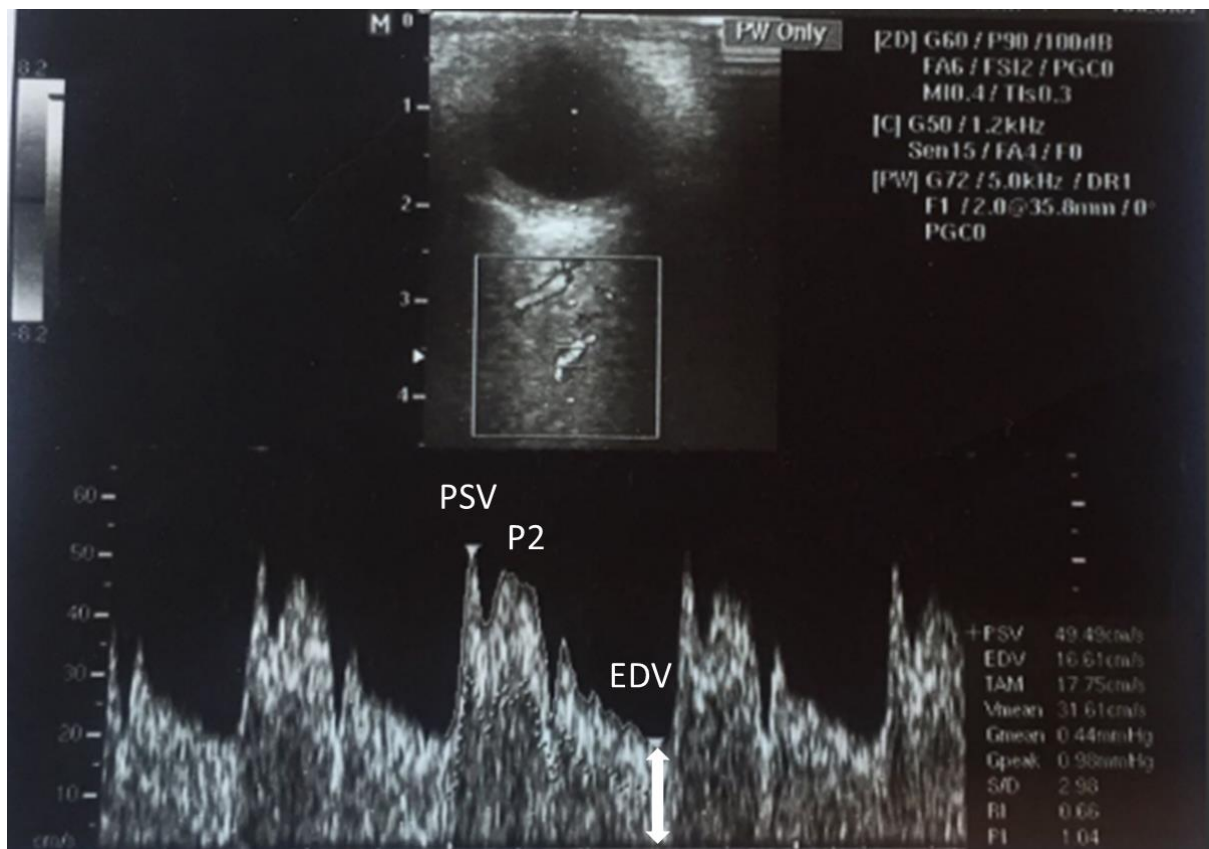


Figure 3.4

