

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (2003) 40 (supl):185-190  
ISSN printed: 1413-9596  
ISSN on-line: 1678-4456

## Quantificação dos níveis de endotelina-1 em placentas e membranas fetais humanas

### Quantification of endothelin-1 level in placentae and human fetal membranes

Agnes Vânia APOLINÁRIO<sup>1</sup>;  
Maria Angélica MIGLINO<sup>2</sup>;  
Yolanda Galindo PACHECO<sup>1</sup>;  
Flávia T. VERECHIA<sup>2</sup>;  
Carlos Eduardo AMBROSIO<sup>2</sup>

1- Universidade de Brasília (UNB), Brasília - DF  
2- Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo - SP

#### Resumo

A endotelina é um peptídeo vasoconstrictor potente que possui funções angiogênicas, mitogênicas e neurotróficas. Neste estudo procurou-se quantificar os níveis de Endotelina -1 (ET-1) em vilos coriônicos placentários e no âmnio de placentas de fetos gemelares, cujas mães submeteram-se à reprodução assistida e fecundação espontânea. Foram colhidas oito amostras de placentas, que após o delivramento placentário, foram colocadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, congeladas e mantidas à -80°C até o processamento por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os níveis de concentração de ET-1 em amostras de vilos coriônicos de placentas de fetos gemelares variaram de 0,52 a 0,70 fmol/ml, enquanto que de fetos únicos variou de 0,47 a 0,86 fmol/ml. A mesma determinação em amostras de âmnio de placentas de gemelares variou de 0,61 a 1,16 fmol/ml, enquanto que de fetos únicos variou de 0,65 a 1,04 fmol/ml. Estes achados indicam que em vilos coriônicos, os níveis de concentração de ET-1 não variaram entre gemelares e fetos únicos. No âmnio, os níveis de ET-1 são mais elevados em gemelares que em fetos únicos, dados que sugerem que o âmnio é a principal fonte de ET-1 presente no líquido amniótico.

#### Palavras-chave:

Placenta humana.  
Endotelina-1.  
Membranas fetais.  
Partos gemelares

#### Correspondência para:

MARIA ANGÉLICA MIGLINO  
Departamento de Cirurgia  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo  
Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira  
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87  
05508-270 - São Paulo - SP  
miglino@usp.br; agnesvm@bol.com.br;  
yolanda@apis.com.br

Recebido para publicação: 24/06/2003  
Aprovado para publicação: 19/02/2004

#### Introdução

A interface materno-fetal consiste a placenta, que é derivada do trofoblasto. As membranas extra-embriônicas compreendem o âmnio, o alantóide e o saco vitelínico. O complexo placentário, o qual consiste da placenta e o cório, é formado para um esforço cooperativo entre os tecidos extra-embriônicos e tecidos endometriais.

O desenvolvimento fetal depende do rápido acesso à circulação materna pela formação da placenta, um processo que requer uma série de eventos envolvendo células especializadas fetais e maternas. A invasão da decidua materna e parede das

arteríolas espirais pelo trofoblasto é um componente primário da placentação humana.<sup>1</sup> Este complexo sistema de vascularização é responsável pela ampla flexibilidade do controle do fluxo através do vilos e constitui, provavelmente o mecanismo que assegura um ótimo fluxo para as transferências materno-fetais e a Endotelina é fundamental para o estabelecimento deste fluxo, pois é um peptídeo vasoconstrictor que desempenha importantes funções nos órgãos genitais femininos, pois é um potente contrator do músculo liso presente no útero e pode reduzir o fluxo placentário através de suas propriedades vasoconstrictoras. O líquido amniótico também contém

Endotelina-1 (ET-1) (Figura 1), a qual provavelmente é originária das células amnióticas.<sup>2</sup> Acredita-se que a ET-1 na placenta humana atue na regulação do desenvolvimento das células mesenquimais placentárias e controle do fluxo sanguíneo placentário. Portanto é muito importante o estudo da ET-1 na placenta e membranas fetais e sua correlação anatomo-endócrina na regulação neuro-hormonal do fluxo placentário. Assim, o objetivo deste trabalho foi quantificar a Endotelina-1 (ET -1) em membranas placentárias humanas (cório e âmnio), obtidas de partos gemelares e/ou únicos após técnica de fertilização assistida, por métodos de fertilização “*in vitro*” ou inseminação intra-uterina, e também de partos espontâneos, resultando em fetos únicos.

## Materiais e Métodos

Neste trabalho foram utilizadas oito placentas de mulheres, sendo quatro de partos gemelares e uma de parto com feto único de mulheres submetidas à tratamentos para infertilidade, e técnica de fertilização *in vitro* e/ou inseminação intra-uterina, realizadas no Centro de Reprodução Humana (Clínica Gênesis - Brasília -DF), e três placentas obtidas de partos, cujas mulheres engravidaram espontaneamente. As pacientes foram submetidas à cesariana, e imediatamente após o delivramento placentário, as amostras de vilos coriônicos e âmnio foram colhidas, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento. Para a detecção da Endotelina-1 diretamente nos vilos coriônicos e âmnio, foi utilizado o kit Endothelin (1-21) [Kit Endothelin (1-21) Biomedica Group® - Áustria], composto por um anticorpo policlonal purificado com alta imuno-afinidade e um anticorpo monoclonal de detecção, ambos específicos para Endotelina (1-21). A análise estatística dos resultados foi executada mediante o teste “t” Student, com significância de  $p > 0,05$ .

## Resultados

### Obtenção da curva padrão

A obtenção da curva padrão foi determinada pela diluição em série da Endotelina-1, onde a leitura de absorção foi determinada com um leitor de ELISA cuja Densidade Óptica (DO) foi de 450 nm. A leitura de absorbância encontra-se na tabela 1, e a curva padrão na figura 1. Após a leitura das absorbâncias determinaram-se as concentrações de Endotelina-1 em todas as amostras empregadas, relacionadas no quadro 1. O estudo da concentração de Endotelina-1 nos vilos coriônicos de gestação de gemelares revelou o valor mínimo de 0,52 fmol/ml e máximo de 0,70 fmol/ml com média de 0,60 fmol/ml representadas na tabela 2 e figura 2. Já a concentração de Endotelina-1 em vilos coriônicos de gestação de fetos únicos demonstrou o valor mínimo de 0,47 fmol/ml e máximo de 0,86 fmol/ml, com média de 0,72 fmol/ml (Tabela 2 e Figura 2). Não houve diferença significativa quanto aos níveis de concentração de Endotelina-1 nos vilos coriônicos quando comparadas às amostras de gestação gemelar cujas mulheres submeteram-se à fecundação assistida e amostras de gestação de fetos únicos procedentes de fecundação espontânea. O estudo da concentração de Endotelina-1 em amostras de âmnio de gestações de gemelares detectou o valor mínimo de 0,61 fmol/ml e valor máximo de 1,16 fmol/ml, com média de 0,81 fmol/ml (Tabela 3 e Figura 3). Já a concentração de Endotelina-1 em amostras de âmnio de gestação única demonstrou o valor mínimo de 0,65 fmol/ml e máximo de 1,04 fmol/ml, com média de 0,84 fmol/ml (Tabela 3 e Figura 3). Não houve diferença significativa quanto aos níveis de concentração de Endotelina-1 no âmnio quando comparadas as amostras de gemelares cujas mulheres submeteram-se a fecundação assistida e amostras de fetos únicos procedentes de fecundação espontânea. Apesar de não haver diferença

significativa entre as concentrações de Endotelinas-1, notou-se que o desvio padrão nos vilos é mais baixo que aquele determinado no âmnio.

## Discussão

A localização da ET-1 foi investigada

por Ferré<sup>3</sup> et al. e Malassiné<sup>7</sup> et al. em culturas de células trofoblásticas e placentas de termo humana. A imunoreatividade para ET-1 foi determinada no endotélio dos vasos e no sinciotrofoblasto dos vilos. Os autores registraram que a principal fonte de ET-1 são os trofoblastos, exercendo uma função endócrina da placenta, tendo um papel

**Tabela 1**

Concentração da Endotelina-1 (fmol/ml) nos vilos coriônicos de placentas de fetos gemelares resultantes de fecundação assistida

Concentração de Endotelina-1 (Vilos**)	N	Média	Amplitude (mínima)	Amplitude (mínima)	Desvio Padrão
Gestação gemelar	3	0,60	0,52	0,70	0,07
Gestação única	3	0,72	0,47	0,86	0,13

\*\*t = -1,94; p > 0,05

**Tabela 2**

Concentração de Endotelina-1 (fmol/ml) no âmnio de placentas de fetos gemelares resultantes de fecundação assistida e de gestação única com fecundação espontânea

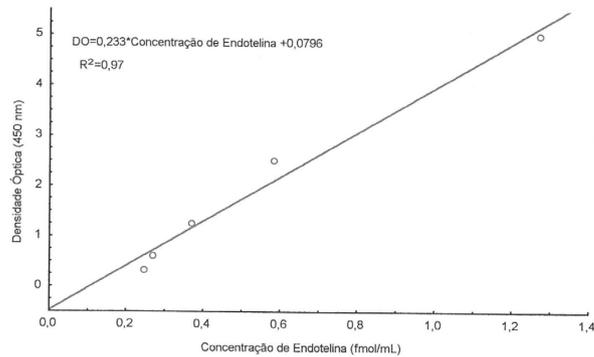
Concentração de Endotelina-1 (Vilos**)	N	Média	Amplitude (mínima)	Amplitude (mínima)	Desvio Padrão
Gestação gemelar	3	0,81	0,61	1,16	0,25
Gestação única	3	0,84	0,65	1,04	0,15

\*\*t = -0,31; p > 0,05

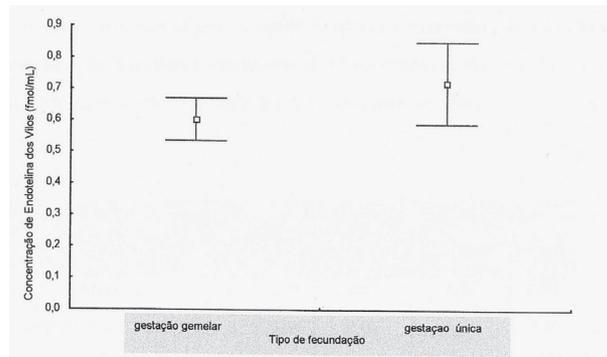
**Quadro 1**

Dados clínicos das pacientes e concentração de Endotelina-1 (fmol/ml) determinadas nas amostras de âmnio e vilos coriônicos

Amostras	Feto	Fertilização	Causa da Infertilidade	Parto	Idade da mãe	Idade fetal (semanas)	ET-1-Âmnio (fmol/ml)	ET-1-Vilos (fmol/ml)
V1A1	Gemelar	In vitro	Fator masculino	2º	38	38	0,65	0,53
V1A1	Gemelar	In vitro	Fator masculino	2º	38	38	0,7	0,52
V2A2	Gemelar	In vitro	Fator masculino	2º	38	38	0,63	0,6
V2A2	Gemelar	In vitro	Fator masculino	2º	38	38	0,61	0,7
V4A4	Gemelar	Inseminação intra-uterina	Fator masculino/ endometriose	1º	30	30	0,67	0,64
V4A4	Gemelar	Inseminação intra-uterina	Fator masculino/ endometriose	1º	30	30	1	0,86
V10A10	Gemelar	In vitro	Fator ovariano	1º	43	43	1,16	0,63
V10A10	Gemelar	In vitro	Fator ovariano	1º	43	43	1,1	0,63
V5A5	Único	Inseminação intra-uterina	Fator masculino	1º	34	34	0,83	1,1
V5A5	Único	Inseminação intra-uterina	Fator masculino	1º	34	34	0,82	0,95
V9A9	Único	Espontâneo	Nenhum	2º	39	39	0,65	0,86
V9A9	Único	Espontâneo	Nenhum	2º	39	39	0,73	0,73
V7A7	Único	Espontâneo	Nenhum	3º	35	35	0,85	0,76
V7A7	Único	Espontâneo	Nenhum	3º	35	35	0,7	0,76
V11A11	Único	Espontâneo	Nenhum	2º	32	32	1,04	0,47
V11A11	Único	Espontâneo	Nenhum	2º	32	32	1	0,73



**Figura 1**  
Curva padrão da densidade óptica em relação à concentração de Endotelina-1 (fmol/ml)



**Figura 2**  
Concentração de Endotelina-1 nos vilos coriônicos de placentas de fetos gemelares resultantes de fecundação assistida e de gestação única com fecundação espontânea ( $p > 0,05$ )

regulador autócrino. Já nos vilos placentários, a proximidade entre o endotélio vascular e as células musculares revelaram um modo de ação parácrino da ET-1. Estas características de regulação de ET-1 em uma via autócrina e parácrina também foram determinadas por Robaut<sup>5</sup> et al. Em nossos estudos, empregamos os vilos coriônicos em sua totalidade, e nossos achados indicam as concentrações mínima e máxima de ET-1 nestes tecidos. Uma vez que as endotelinas atuam no processo de crescimento, a ET-1, seguramente, desempenha importante papel fisiológico nos diferentes processos envolvidos na complexa relação entre o desenvolvimento fetal e placentário durante a gestação.

Fischili<sup>6</sup> et al. trabalharam com comparações de placenta total, utilizando um

volume total de 10g do tecido original, com metodologia parecida com a que empregamos. O limite de detecção definida por 10% de inibição de endotelina ligante encontrado pelos autores foi de 10 pM ou 13 pg (5 fmol) por tubo de ensaio, e não destacaram o tipo de endotelina pesquisada. Em nosso estudo, diferentemente, detectamos a presença específica de ET-1, o que pode justificar maior precisão de nossos resultados, onde trabalhamos com fmol/ml, empregando 20mg de vilos coriônicos.

Myatt<sup>7</sup> e Myatt<sup>8</sup> et al. assinalaram a presença de ET-1 nos vasos feto-placentários, na concentração de 0,8-10pmol/ml, enquanto Fant, Nanu e Word<sup>9</sup> determinaram níveis de 0,1-10 pmol/ml em cultura de fibroblastos placentários. Estas informações indicam que

a concentração de ET-1 nos vasos feto-placentários determinada pelos autores é muito menor que os níveis determinados em nosso estudo, nos vilos coriônicos.

Os estudos para detecção de ET-1 em vilos de placenta de termo, realizados por Hemsén<sup>10</sup> et al. detectaram valores de  $409 \pm 69$  fmol $g^{-1}$  em amostras de placenta, e em amostras de âmnio estes valores foram de  $1416 \pm 177$  fmol $g^{-1}$ . Estes dados estão em concordância com aqueles por nós encontrados, tanto em placentas de fetos gemelares, quanto em placentas de fetos únicos cuja fecundação foi espontânea. Entretanto, os níveis de ET-1 no âmnio de placenta de fetos gemelares foram determinados em valor máximo de 1,16 fmol/ml, enquanto que no âmnio de fetos únicos, o valor máximo foi de 1,04 fmol/ml. Portanto, em âmnio de fetos gemelares provenientes de fecundações assistida, os níveis foram mais altos que no âmnio de fetos de gestação única.

A presença de ET-1 no âmnio foi detectada por Sunnergren<sup>11</sup> et al., indicando que estas membranas avasculares também são fonte de ET-1, dado que confirmamos em nosso experimento.

As concentrações de ET-1 em células de cultura, pesquisadas por Mitchell<sup>12</sup> et al., indicam que os valores de ET-1 variaram de 0,1 - 100 pmol/ml. Em nossos achados, os níveis de ET-1 no âmnio variaram de 0,61 fmol/ml a 1,16 fmol/ml para fetos gemelares e de 0,65 fmol/ml a 1,04 fmol/ml para fetos únicos. Portanto, nossos dados estão em contraste com aqueles apresentados pelos autores citados.

Os níveis de ET-1 foram medidos em tecidos placentários homogeneizados de gestação de termo, âmnio e cório por Van Papendorp<sup>13</sup> et al. que detectaram níveis significativamente maiores no âmnio que no

cório (âmnio -  $249 \pm 13$  fmol/g; cório  $190 \pm 1$  fmol/g). Estes dados entram em concordância com os níveis determinados em nossa pesquisa, que revelaram concentrações maiores no tecido amniótico que nos vilos coriônicos. Entretanto, a concentração de ET-1 no âmnio foi maior nas amostras de placentas de fetos gemelares que nas amostras de fetos únicos, enquanto a concentração de ET-1 não diferiu significativamente entre as amostras de vilos de fetos gemelares e as de fetos únicos.

Janiaux<sup>14</sup> et al., Mondon<sup>15</sup> et al. e Mondon, Anouar e Ferré<sup>16</sup> detectaram a presença de ET-1 em tecido de vilos coriônicos durante o primeiro trimestre de gestação. Este mesmo tipo de Endotelina foi por nós caracterizado nas placentas de partos gemelares e de partos únicos em placentas de termo.

## Conclusões

1) Não houve diferença significativa na concentração de Endotelina-1 nos vilos coriônicos quando comparados os valores em vilos de placentas de gemelares provenientes de fecundação assistida e os níveis de Endotelina-1 em vilos coriônicos de fetos gerados após fecundação espontânea. Este dado é um forte indicativo que os níveis de Endotelina-1 independem do tipo de fecundação, visto que se asseguram as trocas materno-fetais.

2) Não houve diferença significativa na concentração de Endotelina-1 no âmnio quando comparados os valores em âmnio de placentas de gemelares provenientes de fecundação assistida e os níveis de Endotelina-1 em âmnio de fetos gerados após fecundação espontânea. Entretanto, os níveis de Endotelina-1 presente no âmnio de fetos gemelares foram mais elevados que os níveis apresentados no âmnio de fetos únicos.

## Abstract

The endothelin is a potent vasoconstrictor that possess angiogenic, mitogenic and neurotrophical functions. In this study we aimed to quantify the Endothelin-1 (ET-1) levels in chorionic placental villi and amnion of placentae of twins childbirths whose women were submitted

## Key-words:

Human placenta.  
Endothelin-1.  
Fetal membranes.  
Twin birth.

to an assisted pregnancy and spontaneal fecundation. Were collected 08 placental samples. After the placental delivery the samples had been placed in liquid nitrogen and later in a  $-80^{\circ}\text{C}$  until the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique. The concentration levels of ET-1 in samples of chorionic villi in twins placentae varied from 0,52 to 0,70 fmol/ml, while in chorionic villi single gestation varied from 0,47 to 0,86 fmol/ml. The same determination in samples of amnion of twins placentae varied from 0,65 to 1,16 fmol/ml, while in single gestation varied from 0,65 to 1,04 fmol/ml. These findings suggests that in the chorionic villi the levels of ET-1 didn't vary between twins and single gestation. In the amnion the levels of ET-1 are higher in twins than in single gestation, suggesting that the amnion is the source of ET-1 in the amniotic fluid.

## Referências

- DIVYA, P. et al. Differential activity of cathepsin-L in human placenta at two different stages of gestation. **Placenta**, v. 23, p. 59–64, 2002.
- SAGAWA, N. A study on the regulation of intrauterine milieu by bioactive substances of fetal origin in the human amniotic fluid - the analysis of interactions among amnion, chorion laeve, and decidua vera tissues. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, v. 46, n. 8, p. 686-696, 1994.
- FERRÉ, F. et al. Endothelin-1 binding sites and immunoreactivity in the cultured human placental trophoblast- evidence for an autocrine and paracrine role for endothelin-1. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 22, Supplement 8, p. S214-218, 1993.
- MALASSINÉ, A. et al. Localization and production of immunoreactive endothelin-1 in the trophoblast of human placenta. **Cell Tissue Research**, v. 271, n. 3, p. 491-497, 1993.
- ROBAUT, C. et al. Regional distribution and pharmacological characterization of [125I] endothelin-1 binding sites in human fetal placental vessels. **Placenta**, v. 12, p. 55-67, 1991.
- FISCHILLI, W.; CLOLZEL, M.; GUILLY, C. Specific receptor for endothelin on membranes from human placentas. Characterization and use in a binding assay. **Life Sciences**, v. 44, p. 1429-1436, 1989.
- MYATT, L. Control of vascular resistance in the human placenta. **Placenta**, v. 13, n. 4, p. 329-341, 1992.
- MYATT, L. et al. Endothelin-1 induced vasoconstriction is not mediated by thromboxane release and action in the human fetal-placental circulation. **American Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 165, p. 1717-1722, 1991.
- FANT., M. E.; NANU, L.; WORD, R. A. A potential role for endothelin-1 in human placental growth: interactions with the insulin-like growth factor family of peptides. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 74, n. 5, p. 1158-1163, 1992.
- HEMSÉN, A. et al. Characterization, localization and actions of endothelins in umbilical vessels and placenta of man. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 143, p. 395-404, 1991.
- SUNNERGREN, K. P.; WORD, R. A.; SAMP ROOK, J. F.; MACDONALD, P. C.; CASEY, M. K. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 68, p. R-7-R14, 1990.
- MITCHEL, M. D. et al. Actions of endothelin-1 on prostaglandin production gestational tissues. **Prostaglandins**, v. 40, n. 6, p. 627-635, 1990.
- VAN PAPENDORP, C. L. et al. Localization and endogenous concentration of endothelin-like immunoreactivity in human placenta. **Journal of Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 507-511, 1991.
- JANIAUX, E. et al. Placental endothelin gene expression and endothelin concentration in fetal fluids of the first trimester gestational sac. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 8, p. 758-762, 2000.
- MONDON, F. et al. Biochemical characterization and autoradiographic localization of [125I] endothelin-1 binding sites on trophoblast and blood vessels of human placenta. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 76, n. 1, p. 237-244, 1993.
- MONDON, F.; ANOUAR, A.; FERRÉ, F. Endothelin receptor subtypes in the microvillous trophoblastic membrane of early gestation and term human placentae. **European Journal of Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 231-237, 1998.