

**KAREN MATIAS DO PRADO**

**O EFEITO DO MICROAMBIENTE NO COMPORTAMENTO  
PLACENTÁRIO: RESPOSTA DAS VILOSIDADES CORIÔNICAS AO SORO  
MATERNO SAUDÁVEL E PRÉ-ECLÂMPTICO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2019

**KAREN MATIAS DO PRADO**

**O EFEITO DO MICROAMBIENTE NO COMPORTAMENTO  
PLACENTÁRIO: RESPOSTA DAS VILOSIDADES CORIÔNICAS AO SORO  
MATERNO SAUDÁVEL E PRÉ-ECLÂMPTICO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia dos Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:  
Biologia Celular, Tecidual e do  
Desenvolvimento

Orientadora:  
Profa. Dra. Estela Bevilacqua

Versão original

São Paulo  
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Matias do Prado, Karen

O efeito do microambiente no comportamento placentário: resposta das vilosidades coriônicas ao soro materno saudável e pré-eclâmtico. Estudo in vitro. / Karen Matias do Prado; orientador Profa. Dra. Estela Bevilacqua. -- São Paulo, 2019.

92 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Placenta. 2. Pré-eclâmpsia. 3. sFlt-1. 4. PlGF. 5. Citocinas inflamatórias. I. Bevilacqua, Profa. Dra. Estela, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Karen Matias do Prado

Título da tese: O efeito do microambiente no comportamento placentário: resposta das vilosidades coriônicas ao soro materno saudável e pré-eclâmpico.

Orientador(a): Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, considerou

(  ) Aprovado(a)      (  ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_

Presidente: Assinatura: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 26 de junho de 2014.

**PARECER 1186/CEPSH**

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Efeito do soro de gestantes com pré- eclâmpsia sobre a atividade funcional do trofoblasto*" da pesquisadora ESTELA BEVILACQUA e aluna KAREN MATIAS DO PRADO.

Cabe a pesquisadora elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: [icb.usp.br](http://icb.usp.br).

*A pesquisadora cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.*

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.06.2015**.

Atenciosamente,

Prof.ª. Dra. PAOLO M.A.ZANOTTO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

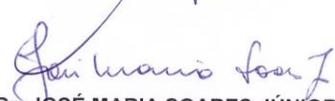
**APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na 214ª reunião no dia 13 de Maio de 2014, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado: "**EFEITO DO SORO DE GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPsia SOBRE A ATIVIDADE FUNCIONAL DO TROFOBLASTO**", dos seguintes pesquisadores: Estela Bevilacqua, Karen Matias do Prado, Mara Sandra Hoshida, Eliane Alves, Rossana Pulcineli Vieira Francisco e Marcelo Zugaib.

São Paulo, 13 de Maio de 2014.



**Prof. Dr. SEIZO MIYADAHIRA**  
Presidente do Comitê de Ética do DOG-FMUSP



**Prof. Dr. JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR**  
Secretário do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

**APROVADO PELO CONSELHO  
DO DOG EM 21/05/2014**



**PROF. DR. MARCELO ZUGAIB**  
Chefe do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Dedico este trabalho**

**À DEUS**

**A toda minha família que compreendeu meu esforço e esteve sempre  
ao meu lado**

**Minha mãe Sheeley e meu pai Agnaldo, meus grandes exemplos**

**À minha irmã Jessyka, pela sua alegria e vontade de vencer**

**Ao meu irmão João Pedro, seu sorriso me fortalece**

**Tive tudo o que precisei para realizar este sonho graças a vocês:**

**AMOR**

**OBRIGADA!**

**À Profa. Dra Estela Bevilacqua**

**Que me recebeu em seu laboratório de braços abertos e me ensinou o que é excelência na pesquisa durante essa trajetória desde a iniciação científica, mestrado e, agora, na conclusão do Doutorado. A Sra. sempre será meu referencial de profissionalismo. Obrigada por acreditar que eu iria conseguir, apesar de todas as pedras que encontramos pela frente e que dificultavam o caminho. As decisões às vezes são difíceis, mas além de tudo isso a Sra. soube como ninguém a hora certa de dar força e encorajar, orientar o caminho.**

**Muito Obrigada!**

## AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, minha irmã e irmão por estarem sempre comigo nos momentos em que mais precisei de um apoio, ou simplesmente desabafar. Foram vocês que me fizeram o que sou;

À Rose Farias que, muito além da técnica de laboratório, tornou-se minha grande amiga (minha “mãe da USP”). Sua inquestionável compreensão das coisas, os ensinamentos aplicáveis dentro e fora do ambiente de trabalho, sua alegria e amizade foram igualmente indispensáveis para o sucesso deste trabalho. Não imagino como seria minha vida sem que você tivesse aparecido. Obrigada pelas orações e pelas palavras que me marcaram para sempre;

À amiga Karla Castro por toda parceria e amizade. Obrigada pelos bons momentos, todas as risadas, as besteiras, as conversas e, principalmente, por estar sempre disposta a ajudar. Continue sempre sendo essa pessoa maravilhosa e íntegra. Muito obrigada por tudo!

À todos os amigos do laboratório Franciele Rodrigues, Carla Bandeira, Elaine Sara Zago e Aline Lorenzon pelo companheirismo, pelas ótimas sugestões que colaboraram para a melhoria deste trabalho. Vocês são partes igualmente importantes para realização deste presente trabalho;

Aos estagiários que me ajudaram em momentos decisivos: Rafael, Jeferson, Yara, Rosana, Felipinho. A todos eu agradeço igualmente e tenho um carinho e admiração especial por todos vocês. Que vocês alcancem seus objetivos e tenham um futuro brilhante;

A todos os colegas e amigos do departamento, especialmente aos amigos do Curso de Verão!

Ao Professor Sérgio Ferreira por disponibilizar seu tempo e atenção sempre que precisei. Por abrir as portas de seu laboratório;

À Professora Dra. Rossana V. F. Pulcinelli e Dra. Mara Hoshida do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e seus técnicos de laboratório Salete, Isaías e Cristina; Por toda colaboração, obrigada!

À Dra. Eliane Alves, pelas orientações durante a seleção das minhas queridas gestantes;

À secretária do departamento Tânia, pelo suporte e orientação nos momentos mais confusos da entrega de muitos documentos;

Aos novos amigos da StemCorp Fernanda, Priscila e Mayara que me apoiaram no último ano, durante a conclusão deste trabalho, me fortalecendo a cada palavra amiga. E aos diretores científicos Éder, Mariane e Natássia que me

deram a oportunidade de estar no time e também, por compreender minhas necessidades acadêmicas neste momento tão importante. Muito obrigada!

A CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

Às gestantes que concordaram e colaboraram para a realização deste sonho, que sem dúvida contribuirá para o sucesso gestacional de outras mulheres.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

**(Arthur Schopenhauer)**

## RESUMO

PRADO, K. M. **O efeito do microambiente no comportamento placentário: resposta das vilosidades coriônicas ao soro materno saudável e pré-eclâmptico. Estudo *in vitro*.** 2019. 92f. Tese (Doutorado em Biologia dos Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

**Objetivos:** Expor vilosidades coriônicas ao soro de gestantes saudáveis ou pré-eclâmpticas e analisar a atividade metabólica celular, o perfil de citocinas inflamatórias e a expressão de fatores angiogênicos destas estruturas.

**Métodos:** Fragmentos da porção fetal (explantes) de placentas a termo (terceiro trimestre) de gestantes saudáveis e pré-eclâmpticas (PE) foram tratados com soro materno pré-eclâmptico e saudável durante 24 horas, a 37°C, em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Foi analisado nas amostras: a atividade metabólica por meio de ensaios de MTT, produção de citocinas (por ELISA: IL-12, IL-6, IL-8, IL-1β, TNF-α e IL-10), e a expressão gênica (por RT-qPCR) e protéica (por ELISA e Western blot) de sFlt-1 e PlGF.

**Resultados:** A atividade metabólica dos explantes placentários não foi afetada pelo tratamento sérico materno. Os explantes de placentas saudáveis tratados com soro PE aumentaram em duas vezes a relação IL-1β: IL-10 e, tiveram aumento da expressão gênica e protéica de sFlt-1 ( $p = 0,005$ ;  $p = 0,008$ , respectivamente) e diminuição da expressão gênica e protéica de PlGF ( $p < 0,05$ ; ambos). O tratamento de explantes PE com soro saudável mostrou uma diminuição de 3,5 vezes na relação IL-1 β: IL-10, expressão elevada de PlGF (gene e proteína,  $p < 0,001$ ) e sFLT-1 (expressão proteica,  $p < 0,05$ ).

**Conclusão:** Explantes vilosos de gestantes saudáveis alteraram seu comportamento em função do ambiente PE, mimetizando essa condição. Os explantes de placentas PE foram mais resistentes a mudanças, mostrando um perfil inflamatório atenuado e um aumento da expressão de PlGF, mas não reduziram a expressão de sFLT-1, como a encontrada em condições saudáveis. Esses dados enfatizam a plasticidade da interface materno-fetal e a possibilidade de um circuito de auto-alimentação resultante de proteínas circulantes interferindo na fisiologia placentária, o que pode ser um fator de agravamento *in vivo*, nas mulheres com PE.

**Palavras-chave:** Placenta, Pré-eclâmpsia, sFlt-1, PlGF, citocinas inflamatórias.

## ABSTRACT

PRADO, K. M. **Effect of the microenvironment on the placental behavior: Response of the chorionic villi to normal and preeclamptic pregnant serum. *In-vitro Assay***. 2019. 92f. PhD thesis (Biology of Systems) – Biomedical Sciences Institute of University of São Paulo, São Paulo, 2019.

**Objectives:** To expose chorionic villi to the serum of healthy or pre-eclamptic pregnant women and to analyze the cellular metabolic activity, the profile of inflammatory cytokines and the expression of angiogenic factors of these structures.

**Methods:** Fragments of the fetal portion (explants) of term placentas (third trimester) of healthy and preeclamptic (PE) pregnant women were treated with healthy and pre-eclamptic maternal serum for 24 hours at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Metabolic activity was assessed by MTT assays, cytokine production by ELISA (IL-12, IL-6, IL-8, IL-1β, TNF-α, and IL-10), and gene and protein expression of sFlt-1 and PlGF by RT-qPCR and ELISA and Western blot, respectively.

**Results:** The metabolic activity of placental explants was not affected by maternal serum treatment. Healthy placenta explants treated with PE serum increased twice the IL-1β: IL-10 ratio and had an increase in sFlt-1 gene and protein expression (p = 0.005, p = 0.008, respectively) and, decreased PlGF gene and protein expression (P <0.05, both). Treatment of PE explants with healthy serum showed a 3.5-fold decrease in IL-1β: IL-10 ratio, high expression of PlGF (gene and protein, p <0.001) and sFLT-1 (protein expression, p < 0.05).

**Conclusion:** Villous explants of healthy pregnant women changed their behavior according to the PE environment, mimicking this condition. PE placenta explants were more resistant to changes, showing an attenuated inflammatory profile and an increased expression of PlGF, but did not reduce sFLT-1 expression, as found in healthy conditions. These data emphasize the plasticity of the maternal-fetal interface and the possibility of a self-feeding circuit resulting from circulating proteins. The interference in placental physiology may be a worsening factor in women with PE.

**Keywords:** Placenta, Preeclampsia, sFlt-1, PlGF, inflammatory cytokines

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia representativa de uma vilosidade coriônica isolada de placenta a termo de gestante saudável.....	51
Figura 2. Atividade metabólica de vilosidades coriônicas obtidas de placentas saudáveis por miligrama de tecido úmido medida po MTT imediatamente após a coleta.....	52
Figura 3. Atividade metabólica de vilosidades coriônicas obtidas de placentas saudáveis e com PE.....	53
Figura 4. Atividade metabólica das vilosidades coriônicas cultivadas por 24 horas em diferentes condições experimentais.....	54
Figura 5. Fotomicrografia de vilos coriônicos obtidos de placenta humana a termo corada por HE .....	55
Figura 6. Contagem de nós sinciciais em placentas de gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia.....	56
Figura 7. Perfil de citocinas em amostras de explantes placentários de mulheres saudáveis tratadas com soro PE.....	58
Figura 8. Perfil de citocinas em amostras de explantes placentários de mulheres com PE tratadas com soro saudável.....	59
Figura 9. Análise da expressão sérica de sFlt-1 e PlGF em mulheres saudáveis e com pré-eclâmpsia.....	60
Figura 10. Análise da expressão protéica dos fatores vasoativos sFlt-1 e PlGF por ELISA.....	61
Figura 11. Análise da expressão protéica dos fatores vasoativos sFlt-1e PlGF por <i>Western Blotting</i> .....	62
Figura 12. Análise da expressão gênica dos fatores vasoativos sFlt-1 e PlGF por RT- <i>qPCR</i> .....	63
Figura Suplementar 1. Análise comparativa do padrão global de produção proteica de fatores vasoativos – <i>Western Blotting</i> .....	90
Figura Suplementar 2. Análise comparativa do padrão global de produção proteica de fatores vasoativos – ELISA.....	91
Figura Suplementar 3. Análise comparativa do padrão global de produção gênica de fatores vasoativos.....	92

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Dados clínicos geral das gestantes saudáveis e pré-eclâmpticas...50

**LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS**

- A1AT – Isoforma 1 da enzima anti-tripsina alfa 1
- APO-L1 – Isoforma 1 da apolipoproteína L1
- BSA – *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)
- CT – Citotrofoblasto
- CTEV – Citotrofoblasto extraviloso
- CO – Monóxido de carbono
- DMEM F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12
- Eng – Endoglina
- EGF – Fator de crescimento epidérmico
- FGF – Fator de crescimento fibroblástico
- FGA – Fibrinogênio alfa
- HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
- HLA-G – Antígeno leucocitário humano G
- HIF-2 $\alpha$  – Fator induzido por hipóxia 2 alfa
- hCG – Gonadotrofina coriônica humana
- IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina
- IFN- $\gamma$  – Interferon gama
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-12 – Interleucina 12
- IL-8 – Interleucina 8
- IL-17 – Interleucina 17
- IUGR – *Intrauterine Growth Restriction* (Restrição de Crescimento Intrauterino)
- ITIH4 – Inibidor inter-alfa-tripsina de cadeia pesada H4
- KCl – Cloreto de potássio
- kDa – kilodaltons
- Kiss1 – Kisspeptina 1
- Kiss1R – Receptor da Kisspeptina 1
- KNG1 – Isoforma 2 da kininogenina 1
- MMP-9 – Metaloproteinase 9

MMP-14 – Metaloproteinase 14

MT-MMPs – Metaloproteinases de membrana

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> – Ortovanadato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

Na-desoxicolato - desoxicolato de sódio

NF-κB – Fator de transcrição nuclear kappa B

NaF – Fluoreto de sódio

NALP3 – NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3

NO – Óxido nítrico

PBS – (*Phosphate buffer saline*) Tampão fosfato

PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico

PDGF-AA – Fator de crescimento derivado de plaquetas AA

PE – Pré-eclâmpsia

PECAM – Moléculas de adesão celular endotelial-plaquetária

PIGF – fator de crescimento placentário

PMSF – *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (Fluoreto de fenilmetilsulfonilo)

RIPA – *Radio-Immunoprecipitation Assay* (Imunoprecipitação de rádio-ensaio)

sFlt-1 – *Soluble fms-like tyrosine kinase-1* (Fator solúvel tirosina-quinase-1 semelhante à fms),

sEng – Endoglina solúvel

TGF-β – Fator transformador do crescimento beta

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Linfócitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>

TGF-β – Fator transformante de crescimento beta

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

TMSB4 – Isoforma 1 da timosina beta 4

VPN – valores preditivos negativos

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VCAM1 – Molécula de adesão celular vascular 1

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VEGF-R1 – Receptor 1 do fator de crescimento do endotélio vascular

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
2. Revisão da literatura.....	23
2.1 Pré-eclâmpsia .....	24
2.1.1 Definição e características clínicas associadas à Pré-eclâmpsia.....	24
2.1.2 Desordens hipertensivas da gestação, PE e seus subtipos.....	26
2.1.3 Predição e tratamento da PE.....	27
2.1.4 Patofisiologia da PE .....	28
2.3 O ambiente pré-eclâmpico.....	29
2.2 O papel da placenta na PE.....	31
2.2.1 Relação entre a fisiologia da célula trofoblástica e a PE.....	31
2.2.2 Produção de fatores vasoativos na PE .....	33
3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	37
4. OBJETIVOS.....	38
4.1 Objetivo Geral.....	39
4.2 Objetivos Específicos.....	39
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1 Pacientes.....	41
5.2 Coleta de amostras de sangue e placenta.....	41
5.3 Obtenção das vilosidades coriônicas de placenta humana a termo e tratamento com o soro materno.....	42
5.3.1 Isolamento e cultivo de vilosidades coriônicas.....	42
5.3.2 Condições experimentais dos ensaios.....	43
5.3.3 Tratamento com soro materno de gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia.....	43
5.4 Ensaio de atividade metabólica utilizando MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium.....	44
5.5 Caracterização morfológica dos explantes vilosos.....	44
5.5.1 HE e contagem de nós sinciciais.....	45
5.6 Análise de citocinas de perfil pró e anti-inflamatório por CBA.....	45
5.7 Análise do perfil de produção de sFlt-1 e PlGF placentários.....	46
5.7.1 Expressão proteica sFlt-1 e PlGF por Western Blot.....	46

5.7.2 Expressão proteica sFlt-1 e PlGF por ELISA.....	47
5.8 Expressão gênica de sFlt-1 e PlGF.....	47
5.9 Análise estatística.....	48
6. RESULTADOS.....	49
6.1 Características clínicas das gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia.....	50
6.2. Atividade metabólica dos explantes placentários tratados com soro materno.....	51
6.3. Caracterização morfológica e histoquímica dos explantes vilosos.....	54
6.3.1 Nós sinciciais.....	54
6.4 Análises de citocinas de perfil pró e anti-inflamatório.....	57
6.5 Produção de sFlt-1 e PlGF pelos vilos corionicos cultivados.....	60
6.5.1 Realização dos ensaios de expressão proteica – ELISA.....	60
6.5.2 Realização dos ensaios de expressão proteica – Western Blotting.....	61
6.5.3 Realização dos ensaios de expressão gênica.....	63
7. DISCUSSÃO.....	64
7.1 Características das gestantes selecionadas para esse estudo.....	66
7.2 O efeito do ambiente sobre a atividade metabólica dos vilos e do sinciciotrofoblasto.....	67
7.3 Alterações na expressão de fatores angiogênicos sFlt-1 e PlGF em função do microambiente.....	70
7.4 A modulação do perfil de citocinas.....	72
7.5 Considerações finais.....	74
8. CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO 1. Reagentes e suas procedências.....	89

## **1. Introdução**

A Pré-eclâmpsia (PE) é uma doença hipertensiva específica da gestação que é a principal causa de mortalidade e morbidade materna e fetal em todo o mundo. É caracterizada pelo surgimento de hipertensão e proteinúria após a 20ª semana de gestação, acometendo cerca de 10% das gestações em todo o mundo. A cada ano, estima-se que a hipertensão durante a gestação, particularmente a PE, compromete cerca de 10 milhões de gestações resultando em 76.000 mortes maternas e 500 mil perdas fetais e de neonatos. Embora sua etiologia não esteja bem estabelecida devido à sua natureza multifatorial, existe uma ampla rede de teorias sobre seu desenvolvimento e manifestação da sintomatologia clínica. Dentre essas a placentação inadequada devido ao remodelamento incompleto das artérias espiraladas uterinas causando, principalmente, estresse oxidativo, hipoperfusão placentária e disfunção endotelial são características marcantes bem estabelecidas na literatura sobre a PE.

Nesta condição, as células do citotrofoblasto extraviloso falham em invadir o endométrio materno e remodelar o leito vascular, impedindo a transformação das artérias espiraladas. Este fenômeno dificulta o fluxo sanguíneo para a placenta e também resulta em uma alta pressão de perfusão no espaço interviloso. Esse estresse gera um ambiente com baixa disponibilidade de oxigênio e lesão das porções terminais das vilosidades coriônicas que se rompem e liberam fragmentos celulares, micropartículas e vesículas extracelulares na circulação materna. A partir disso, instala-se um ambiente inflamatório sistêmico que promove, dentre outras alterações, a disfunção endotelial. Em condições patológicas, como a PE, observa-se também um desequilíbrio na formação e liberação de fatores vasoativos pela placenta na circulação materna.

Os muitos estudos sobre a PE ressaltam modificações do padrão gênico nos compartimentos uterinos, vasculares e imunológicos do organismo materno e na placenta e organismo fetal. Além disto, mostram claramente alterações no padrão sérico de proteínas-chave, o que também influencia os territórios placentários, na medida em que os vilos coriônicos são completamente banhados pelo sangue materno durante a gestação. Com base nas evidências

descritas, notamos que esta área na literatura é muito rica, com a preocupação de avaliar a deficiência na invasão vascular por parte do trofoblasto e a participação destas células na composição de fatores presentes no soro, correlacionando-os à disfunção endotelial, aos quadros de hipertensão gestacional e a instalação da PE.

Ao contrário, não tem recebido muita atenção na literatura às condições maternas e/ou locais, que estabelecidas na PE poderiam agir direta ou indiretamente sobre a fisiologia placentária. Estudos prévios mostraram que o soro de pacientes com pré-eclâmpsia pode levar a disfunção endotelial em diferentes graus. Em relação às células trofoblásticas, entretanto, não se avaliou ainda se o ambiente pré-eclâmpico altera o perfil funcional dessa população, seja diminuindo a atividade invasiva destas células, induzindo a expressão de moléculas-chave na ativação do sistema vascular materno, ou ainda levando à morte destas células no interstício do estroma endometrial e desta forma diminuindo o contingente de células capazes de remodelar os vasos arteriais uterinos.

Neste contexto, a hipótese desta proposta de investigação é que a expressão alterada de fatores séricos anti-angiogênicos e de ativação vascular que predominam nas gestantes com PE contribuem para o agravamento desta doença. Em outras palavras, pretendemos responder se o ambiente pré-eclâmpico retroalimenta a expressão de fatores associados à manifestação e agravamento da PE nas células trofoblásticas.

## **2. Revisão da literatura**

## 2.1 Pré-eclâmpsia

### 2.1.1 Definição e características clínicas associadas à Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE), é uma doença multifatorial sistêmica específica da gestação que atinge aproximadamente de 5 a 8% das gestações. É classicamente caracterizada pela manifestação de hipertensão arterial, em mulheres previamente normotensas, e proteinúria detectáveis após a 20 semana de gestação (STEEGERS *et al.*, 2010). Os critérios clínicos incluem pressão sanguínea sistólica maior ou igual à 140 mmHg e diastólica de 90 mmHg, e valores de proteinúria superiores à 0,3 g em 24 horas.

Em 2014, a Sociedade Internacional para o Estudo da Hipertensão na Gestação (*ISSHP – International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*) atualizou os critérios para o diagnóstico clínico da PE. A hipertensão combinada ou com a proteinúria ou à outra disfunção como a insuficiência renal e hepática, distúrbios neurológicos ou complicações hematológicas, disfunção uteroplacentárias ou restrição de crescimento, podem caracterizar o surgimento da PE. A proteinúria não é mais necessária nesta nova definição, podendo a PE agora ser subdividida em duas subcategorias na presença ou ausência de proteinúria. Essa ampla definição reflete a heterogeneidade na apresentação clínica da PE, o que sugere também uma possível heterogeneidade na patogênese dessa síndrome.

Trata-se de uma das principais causas de mortalidade e morbidade materna e perinatal. Estima-se que a PE possa afetar aproximadamente 10 milhões de gestações, resultando em aproximadamente 75 mil mortes maternas por ano em todo o mundo sendo que a maior parte acomete os países em desenvolvimento, onde o acesso ao sistema de saúde pode ser mais dificultado. Paralelamente, o número de mortes fetais ou de neonatos pode chegar a 500 mil por ano (WHO, 2005; KUKLINA, *et al.*, 2009; DULEY, 2009).

Quando não assistidas adequadamente, gestantes com PE podem apresentar severas complicações como a eclâmpsia, ruptura hepática, edema

pulmonar ou insuficiência renal que podem ser fatais (SOUZA et al., 2013). A PE diminui a qualidade de vida e aumenta o risco de depressão pós-parto (PRICK et al., 2015). Está associada também a um maior risco de desenvolvimento de doenças em longo prazo, tanto pela mãe como pelo neonato (ZHONG et al., 2010). Neste contexto, têm se constatado que gestantes com PE apresentam maior risco para a ocorrência de infarto de miocárdio (RAY et al., 2005) ou *diabetes mellitus* (WEISSGERBER; MUDD, 2015) em relação a mulheres com gestações saudáveis. Além disso, filhos de gestantes com PE apresentam cerca de 2 a 8 vezes maior risco de hipertensão, doenças cardiovasculares e *diabetes mellitus* em sua vida adulta (BARKER et al., 2006; GLUCKMAN et al., 2008).

As causas para o desenvolvimento da PE ainda são obscuras, mas a distinção entre mulheres que apresentam baixo ou alto risco é possível. Alguns fatores de risco pré-dispõem mulheres ao desenvolvimento desta patologia incluem principalmente PE anterior, *Diabetes mellitus*, obesidade, histórico familiar de PE, idade materna, histórico de doença crônica de rins, hipertensão prévia e síndrome do anticorpo anti-fosfolipídica (DUCKITT; HARRINGTON, 2005). Os riscos moderados compreendem idade materna acima dos 40 anos, índice de massa corporal igual ou maior 35 kg/m<sup>2</sup>, síndrome do ovário policístico, histórico familiar de PE e gestações múltiplas (MAGEE et al., 2008; BRAMHAM et al., 2014).

Em países em desenvolvimento, onde o acesso ao sistema de saúde pode ser limitado, estima-se que a PE causa mais de 60.000 mortes maternas por ano. Já em países desenvolvidos onde a indução do parto prematuro é a conduta adotada para proteger a integridade materna, resulta em mortalidade e morbidade do neonato devido a sequelas de prematuridade e baixo peso ao nascer (DULEY et al., 2009).

A PE é mais comum, porém não exclusiva, em nulíparas, sendo que dentro das múltiparas, novos parceiros aumentam o risco de desencadeamento da doença, o que sugere uma correlação imunológica (ROBILLARD et al., 1993). Estudos também têm demonstrado que a exposição prolongada ao

esperma paterno diminui o risco de PE, assim como um aborto ou uma gestação normal prévia (SAFTLAS et al., 2013).

Neonatos de mães que desenvolvem PE podem ser acometidos por restrição do crescimento fetal (IUGR, *intrauterine growth restriction*) caracterizada pelo crescimento fetal abaixo do percentil 10 para a idade gestacional (THORNTON et al., 2004) resultando em prematuridade e, em casos mais graves, óbito fetal. A restrição de crescimento é uma complicação comum nos casos de PE, entretanto, ainda não está esclarecido porque algumas mulheres com insuficiência placentária podem manifestar a síndrome de PE sem apresentar IUGR fetal. De fato, ambas as condições (PE e IUGR) podem compartilhar fundamentos patofisiológicos comuns no que diz respeito ao desenvolvimento vascular placentário, o que tem levado os pesquisadores ao consenso de que a variabilidade individual (variação genética e ambiental) pode alterar a resposta e adaptação materna frente à doença desencadeada (MYATT, 2006; LONGTINE; NELSON, 2011).

### *2.1.2 Desordens hipertensivas da gestação, PE e seus subtipos*

Doenças hipertensivas que ocorrem durante a gestação podem ser classificadas em quatro grupos: 1) Hipertensão crônica, 2) Hipertensão crônica com PE superajuntada, 3) Hipertensão gestacional e 4) PE e eclâmpsia. A classificação clínica dos diferentes tipos é baseada primariamente na idade gestacional, pressão sanguínea e complicações concomitantes (HUPPERTZ, 2018).

A hipertensão crônica é diagnosticada em mulheres grávidas que apresentam alteração da pressão arterial nas primeiras semanas de gestação (antes da 20ª semana) sendo, por tanto, atribuída a uma condição prévia não diagnosticada e não, necessariamente, à gestação. Quando mulheres previamente hipertensas passam a apresentar proteinúria durante a gestação, são diagnosticadas com PE superajuntada. Por outro lado, o quadro de hipertensão arterial manifestado especificamente durante a gestação (após a

20ª semana), sem sinal de proteinúria, é classificado como hipertensão gestacional (COSTA et al., 2016).

Na condição em que uma gestante previamente normotensa, passa a apresentar picos hipertensivos detectáveis a partir 20ª semana, concomitante à proteinúria, diagnostica-se essa gestante como pré-eclâmptica. Baseado na idade gestacional na qual estes sintomas característicos são detectados, a PE pode ser subdividida em PE precoce (idade gestacional inferior a 34 semanas) ou tardia (idade gestacional superior a 34 semanas). Esta classificação tem relação direta com o prognóstico materno e fetal durante a gestação. Quanto mais precocemente ocorre a manifestação dos sintomas, maior é o grau de comprometimento do desenvolvimento placentário e, portanto, maiores são as probabilidades de complicações para mãe e para o feto em desenvolvimento, que podem levar a ocorrência de parto prematuro, descolamento de placenta ou até mesmo ao óbito (COSTA et al., 2016).

### *2.1.3 Predição e tratamento da PE*

Mesmo sendo reconhecida como uma grave doença gestacional com impacto em nível mundial, o diagnóstico preciso da PE ainda é muito elusivo, pois não existe um teste de triagem de acurácia suficientemente preciso para ser amplamente utilizado na área clínica. A busca por uma combinação de biomarcadores parece ser desta forma, o método mais promissor no momento (CONDE-AGUDELO et al., 2004; GRILL et al., 2009).

Em 2010, Kenny e colaboradores realizaram a descrição do perfil de metabólitos a partir do plasma de pacientes com PE durante a 15ª semana de gestação. As assinaturas metabolômicas variaram entre carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos, hormônios esteroides ou seus derivados. Os testes apresentaram 70% de sensibilidade e 95% de especificidade, o que poderia auxiliar na conduta inicial e tratamento precoce mais adequado (KENNY et al., 2010). Todos estes modelos, porém, necessitam ser validados antes que possam ser utilizados na prática clínica.

Em grandes centros de estudo, fatores de risco clínicos combinados com alterações na concentração sanguínea de fatores angiogênicos entre o primeiro e o começo do segundo trimestre de gestação pode predizer o surgimento da PE precoce, com uma especificidade de 80% e sensibilidade de 88% (MYATT et al., 2013). Outros estudos apontam a utilização da ultrassonografia da artéria uterina por Doppler na 20ª semana de gestação (KENNY et al., 2014), como ferramenta adicional no diagnóstico preciso da PE.

#### *2.1.4 Patofisiologia da PE*

A gestação é uma condição fisiologicamente desafiadora que gera uma série de adaptações funcionais ao sistema cardiovascular materno, sendo que o impacto da gestação neste sistema pode persistir da concepção ao nascimento. A má adaptação do organismo materno à esta condição, pode favorecer o surgimento de diferentes patologias gestacionais. Evidências recentes sugerem que as alterações vasculares associadas a complicações durante a gestação, como a PE, podem afetar a função do sistema vascular materno e do neonato após o parto, trazendo complicações durante sua vida adulta (HUPPERTZ, 2018).

A disfunção vascular e hemodinâmica anormal materna são características comuns na PE e podem ser observadas tanto no compartimento uteroplacentário, quanto sistemicamente em outros órgãos. Evidências para a disfunção endotelial na PE incluem aumento da reatividade vascular em resposta a estímulo vasoconstritor e, aumento de biomarcadores associados à injúria e à ativação endotelial periférica. A função endotelial comprometida, remodelamento incompleto das artérias espiraladas uterinas, vasoconstrição sistêmica, estresse oxidativo e inflamação são algumas das características mais proeminentes na condição pré-eclâmptica (GOULOPOULOU, 2015).

A disfunção endotelial tem sido considerada um fator crítico para o desenvolvimento da PE, embora ainda se desconheça se esta disfunção precede a gestação ou se pode ser causada por eventos patofisiológicos no início da gestação. Da mesma forma, não está bem estabelecido por quanto

tempo esta disfunção vascular pode persistir no período pós-parto, representando um risco real para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares futuras nessas mulheres (WEISSGERBER et al., 2016). Neste contexto, Weissgerber e colaboradores (2016) realizaram uma meta-análise e revisões sistemáticas de estudos que avaliaram a disfunção endotelial em gestantes utilizando um método que mede a dilatação arterial quando ocorre a passagem de sangue (*FMD – Flow-mediated dilation*), para elucidar o período no qual a disfunção vascular poderia ser detectada. Entre as mulheres que acabaram desenvolvendo PE, foi observada menor dilatação vascular e conseqüentemente menor fluxo sanguíneo nas artérias antes do diagnóstico clínico (entre 20 e 29 semanas), no momento da manifestação clínica dos sintomas e por até 3 anos após o parto. Estes resultados sugerem que a disfunção vascular precede a PE e, pode contribuir para a sua patogênese, além de poder estar associada a alto risco de doenças cardiovasculares em momentos posteriores.

### **2.3 O ambiente pré-eclâmpico**

Um fator histopatológico importante na PE é a invasão superficial do trofoblasto extraviloso na decídua basal e a remodelação incompleta ou ausente das artérias espiraladas uterinas, o que leva à diminuição da perfusão uteroplacentária. Esta redução da perfusão tem sido amplamente sugerida como causa de hipóxia placentária, um evento que pode alterar a fisiologia das células placentárias e dar início às manifestações clínicas da doença. Também foi observado que a indução da hipóxia *in vitro* aumenta a expressão do fator solúvel tirosina-quinase-1 semelhante à *fms* (*soluble fms-like tyrosine kinase-1 - sFlt-1*), fator induzido por hipóxia 2 alfa (HIF-2 $\alpha$ ), leptina e gonadotrofina coriônica humana (hCG) (SOLEYMANLOU et al., 2005; MCCARTHY et al., 2007) em trofoblasto humano, sendo os dois últimos também associados a regulação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (ISLAMI et al., 2003).

Fatores inflamatórios também têm sido considerados de relevância na PE, principalmente como fatores de ativação e disfunção endotelial. Ferguson e colaboradores (2017) exploraram trajetórias longitudinais, começando no início da gestação, de um painel de marcadores de inflamação e estresse oxidativo em mulheres com gestações pré-eclâmpticas e normotensas. Os biomarcadores de estresse oxidativo incluíram 8-isoprostano e 8-hidroxi-desoxiguanosina e os de inflamação, a proteína C reativa, as interleucinas (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Os biomarcadores de inflamação e de estresse oxidativo mostraram diferentes padrões durante a gestação, começando ao redor da 10<sup>a</sup> semana. No entanto, é no início do segundo trimestre que se torna particularmente importante a medição destes biomarcadores. Embora os biomarcadores isoladamente não tenham sido suficientes para predição da pré-eclâmpsia, têm sido úteis para a compreensão do perfil inflamatório materno na gravidez antes do desenvolvimento da doença. Além disso, são fundamentais para o delineamento de medidas potencialmente preventivas.

Vianna e colaboradores (2016) realizaram um paralelo entre o sistema imunológico e o perfil de citocinas em gestações saudáveis e patológicas. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram fenotipadas para os marcadores de ativação imunológica precoce (CD25 e CD69), marcadores de células T reguladoras (CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>), HLA-G e IL-2 (receptor HLA-G). A proliferação de linfócitos foi estimada assim como os níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  (interferon-gama), TNF- $\alpha$  e IL-17. Os autores mostraram que o desequilíbrio de citocinas apresentado na PE está associado a um perfil regulatório imune deficiente, contribuindo para uma diminuição da tolerância imunológica entre mãe e feto.

## 2.2 O papel da placenta na PE

### 2.2.1 Relação entre a fisiologia da célula trofoblástica e a PE

As primeiras evidências sobre a reduzida invasão trofoblástica e ausência de remodelamento das artérias espiraladas do leito placentário em gestações associadas à PE foram reportadas no início da década de 70 (BROSENS et al., 1972). Estes achados abriram novas perspectivas de estudo sobre os mecanismos que regulam a invasão do trofoblasto, constituindo atualmente uma relevante área de investigação científica em placenta.

Os processos de invasão trofoblástica e angiogênese são essenciais para o sucesso gestacional. Durante o desenvolvimento placentário normal, as células do citotrofoblasto que proliferaram a partir do topo das vilosidades de ancoragem, invadem a mucosa uterina e estabelecem uma interface de interação entre mãe e feto (invasão intersticial). Estas células recebem em conjunto a denominação de citotrofoblasto extraviloso (CTEV) e, apresentam marcadores bioquímicos específicos tais como a expressão de HLA-G e de Kiss1, Kiss1R e metaloproteinase 9 (MMP-9), envolvidos na atividade invasiva trofoblástica durante a formação da placenta (MATJILA et al., 2013).

Um processo de vital importância é a interação do CTEV com a rede vascular do endométrio e de parte do miométrio. Este processo inclui a remodelação das artérias espiraladas, com a substituição de suas células endoteliais e musculares lisas pelo CTEV (invasão endovascular, CTEV endovascular). Este processo, leva à perda da atividade contrátil destes vasos (BURTON; JAUNIAUX, 2017). Esta população de células citotrofoblásticas é denominada de endovascular e é responsável pela transformação destes vasos de alta resistência em vasos de baixa resistência e alta capacidade de condução do fluxo sanguíneo para o espaço interviloso da placenta (HE et al., 2017). Ao mesmo tempo, passam a ser menos responsivos a substâncias vasoconstritoras. Essa transformação é acompanhada por mudanças fenotípicas, na qual as células do CTEV deixam de expressar moléculas de origem epitelial como a E-caderina e a integrina  $\alpha_6\beta_4$  e passam a expressar

moléculas de superfície vascular. Estas características conferem ao CTEV identidade arterial, expressando moléculas de adesão celular endotelial-plaquetária (PECAM), VE-caderina, molécula de adesão celular vascular (VCAM1) e integrinas  $\alpha_4$  e  $\alpha_v\beta_3$  (ZHOU et al., 1997). Da mesma forma, estas células passam a modular a expressão de moléculas angio/vasculogênicas incluindo membros da família do VEGF (ZHOU et al., 2002). Além disso, as células CTEV intersticiais presentes na decídua podem secretar agentes vasodilatadores (óxido nítrico – NO, monóxido de carbono – CO, etc.) que atuam nas artérias espiraladas antes da destruição causada pelo CTEV endovascular (LYALL, 2005).

Essas transformações são necessárias para garantir o suprimento sanguíneo adequado para a placenta e para as trocas moleculares e gasosas com o feto em desenvolvimento. Alterações nesta dinâmica podem levar a inúmeras complicações gestacionais. No desenvolvimento da PE a presença da placenta, mas não do feto é um fator preponderante. Características clínicas desta síndrome podem se manifestar na ausência de feto, como a mola hidatiforme e desaparecem com a remoção da placenta (REDMAN, 1991).

Na literatura, o processo fisiopatológico da PE tem sido abordado em dois estágios: placentação anormal e, na sequência uma resposta materna, o que leva à manifestação clínica dos sintomas (REDMAN et al., 2014). Na PE, a capacidade invasiva do CTEV está bastante comprometida, sendo a invasão intersticial limitada. As regiões superficiais do endométrio e a invasão endovascular é incompleta. A mudança fenotípica (epitelial-vascular) que é observada no CTEV em contexto fisiológico normal não ocorre na PE; também se observa aumento nas taxas de morte celular por apoptose nestas células (DI FEDERICO et al., 1999; ZHOU et al., 2002; HUNKAPILLER et al., 2011). A reduzida invasividade trofoblástica é um fator crucial no surgimento da PE, o que tem sido correlacionado a deficiências na expressão de Kiss1 e seu receptor nestas células (CARTWRIGHT; WILLIAMS, 2012).

Entre os potenciais mecanismos associados à insuficiência placentária, têm sido enfatizados aqueles exclusivamente inerentes ao trofoblasto como perda de seu fenótipo vascular (ZHOU et al., 1997), menor capacidade de

síntese de NO (MARTIN; CONRAD, 2000) e perda da função normal pela deficiente oxigenação (ZHOU et al., 1998; CANNIGIA et al., 2000).

Outra possibilidade inclui fatores associados ao trofoblasto extraviloso (fatores intrínsecos) e mecanismos de origem materna (fatores extrínsecos) (ASHKAR et al., 2000; REISTER et al., 2001). Uma revisão de Knöfler e Pollheimer (2012) relaciona fatores de crescimento, citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), quimiocinas, prostaglandinas e fatores angiogênicos que, produzidos e secretados por células presentes na decídua, podem promover ou inibir processos de invasão e/ou migração nas células trofoblásticas. Corrobora ainda essa possibilidade, a ação do sobrenadante de cultura de células estromais da decídua favorecendo a invasão do trofoblasto em gestações consideradas normais (ZHU et al., 2009; GODBOLE et al., 2011; GONZALEZ et al., 2011). Estes achados, entretanto, têm sido questionados por terem sido gerados com o uso de linhagens trofoblásticas.

### 2.2.2 Produção de fatores vasoativos na PE

Uma rede de interações moleculares é necessária para garantir a placentação adequada. Neste contexto, o comprometimento da invasão e da aquisição de um fenótipo vascular pelo CTEV observado na PE pode ser uma consequência da concentração local insuficiente de fatores vasoativos como o VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), o PlGF (fator de crescimento placentário) e seus receptores, altamente expressos durante a placentação normal (SHARKEY et al., 1993).

O VEGF tem papel chave no processo de angiogênese e atua através de dois receptores tirosino-quinases dependentes: VEGF-R1 (também conhecido como Flt-1) e VEGF-R2 expressos na superfície de células endoteliais. O VEGF-R1 possui duas isoformas, uma transmembrana e outra solúvel (sFlt-1, *soluble fms-like tyrosine kinase-1*) (FAN et al., 2014; PALMER et al., 2017). A isoforma de membrana Flt-1 é expressa pelo CTEV nas fases iniciais da gestação (ZHOU et al., 2002). Sua interação com VEGF e PlGF tem grande importância no processo de invasão trofoblástica e vasculogênese. A

isoforma solúvel (sFlt-1) é uma proteína anti-angiogênica originada através de um *splicing* alternativo na qual o domínio transmembrana e citoplasmático do Flt-1 é perdido (PALMER *et al.*, 2017). Essa isoforma pode interagir com o VEGF e PlGF circulantes, impedindo suas interações com a isoforma de membrana, regulando assim processos angiogênicos mediados por estes fatores de crescimento e no contexto pré-eclâmpico, a placenta humana pode produzir e liberar grandes quantidades de sFlt-1 para a circulação materna (MAYNARD *et al.*, 2003).

As endoglinas (Eng) são correceptores do TGF- $\beta$  (fator transformante de crescimento  $\beta$ ) altamente expressas por células endoteliais e pelo sincitiotrofoblasto (VENKATESHA *et al.*, 2006). A placenta pode produzir a isoforma solúvel desta proteína (sEng) que, assim como o sFlt1, possui propriedades anti-angiogênicas (MAYNARD *et al.*, 2003). Além da associação das sEng com TGF- $\beta$  no contexto da PE, tem sido discutido também a relação da produção de sEng em associação com MT-MMPs (metaloproteinases de membrana) expressas por células trofoblásticas invasivas durante o primeiro e terceiro trimestres (KAITU'U-LINO *et al.*, 2013). Foi recentemente demonstrado que MMP-14 é expressa pela placenta de mulheres com PE e que esta enzima pode interagir com a Eng no sincitiotrofoblasto (ZHANG *et al.*, 2018). Adicionalmente, também foi mostrado que a produção de sEng por células BeWo sincicializadas e silenciadas para MMP-14 diminui, sugerindo que a interação com MMP-14 é responsável pela produção de sEng durante a PE (KAITU'U-LINO *et al.*, 2012).

O aumento dos peptídeos anti-angiogênicos como sFlt-1 e sEng têm sido descritos na PE (NORIS *et al.*, 2005; GU *et al.*, 2008; AGGARWAL *et al.*, 2012), aonde se postula que, ao se ligarem ao VEGF, PlGF e TGF- $\beta$  circulantes impedem a união destas moléculas pró-angiogênicas a seus receptores nativos presentes no endotélio (ação antagonista) e, desta forma, comprometem o processo angiogênico e a função vascular (ROBERTS *et al.*, 2008).

Mulheres com baixos níveis plasmáticos de PlGF no primeiro trimestre de gravidez têm risco muito maior de PE ao atingirem o terceiro trimestre (seis

vezes maior), quando comparadas àquelas com concentrações maiores de PIGF. De forma semelhante, mulheres com PE apresentam níveis de RNAm para VEGF diminuídos. O desequilíbrio caracterizado pelo aumento de peptídeos anti-angiogênicos (sFlt-1 e sEng) associado à diminuição da disponibilidade de fatores que podem promover os processos de angiogênese (VEGF, PIGF e TGF- $\beta$ ) têm sido relacionados aos processos anormais de placentação como a placentação superficial observada na PE e utilizados como preditores e marcadores da pré-eclâmpsia. Estes marcadores assumem hoje um valor clínico para diagnóstico de importância ímpar na medida em que se observou que o aumento nos níveis plasmáticos de sFlt-1 e a diminuição de PLGF antecedem em seis semanas a manifestação clínica da doença (LEVINE et al., 2004).

Abordagem proteômica do soro de gestantes com PE mostraram ainda uma gama muito maior de fatores diferencialmente presentes nesta condição e que incluem: proteínas precursoras do fibrinogênio alfa (FGA), a isoforma1 da enzima anti-tripsina alfa 1 (A1AT), a isoforma 1 da apolipoproteína L1 (APO-L1), o inibidor inter-alfa-tripsina de cadeia pesada H4 (ITIH4), a isoforma 2 da kininogenina-1 (KNG1) e a isoforma 1 da timosina beta 4 (TMSB4). Estas moléculas são conhecidas pela participação na defesa imunológica e inflamação aguda, entre outros processos (WEN et al., 2013).

### **3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

Os muitos estudos sobre a PE ressaltam modificações do padrão gênico nos compartimentos uterinos, vasculares e imunológicos do organismo materno, na placenta e no organismo fetal (FOUNDINGS et al., 2009; HUPPERTZ, 2015). Além disto, mostram claramente alterações no padrão sérico de proteínas-chave, o que também influencia os territórios placentários, na medida em que os vilos coriônicos são completamente banhados pelo sangue materno durante a gestação (EL-SAYED, 2017). A literatura científica e clínica tem se preocupado em avaliar os mecanismos associados à deficiência da invasão vascular por parte do trofoblasto e a participação destas células na composição de fatores presentes no soro, correlacionando-os à disfunção endotelial, aos quadros de hipertensão gestacional e a instalação da PE (EL-SAYED, 2017). Ao contrário, as condições maternas e/ou locais, que estabelecidas na PE poderiam agir direta ou indiretamente sobre a fisiologia placentária não tem recebido a mesma atenção.

Estudos prévios mostraram que o soro de pacientes com pré-eclâmpsia pode levar a disfunção endotelial em diferentes graus (MORI et al., 2014). Em relação às células trofoblásticas, entretanto, não se avaliou ainda se o ambiente pré-eclâmpico altera o perfil funcional dessa população, seja diminuindo a atividade invasiva destas células, induzindo a expressão de moléculas-chave na ativação do sistema vascular materno, ou ainda levando à morte destas células no interstício do estroma endometrial e desta forma diminuindo o contingente de células capazes de remodelar os vasos arteriais uterinos.

Neste contexto, a hipótese desta proposta de investigação é que a expressão alterada de fatores séricos anti-angiogênicos e de ativação vascular que predominam e circulam no sangue das gestantes com PE, contribuem para o agravamento desta doença. Em outras palavras, pretendemos responder se o ambiente pré-eclâmpico retroalimenta a expressão de fatores associados à manifestação e agravamento da PE pelas células trofoblásticas.

#### **4. OBJETIVOS**

#### 4.1 Objetivo Geral

Analisar se o microambiente pode modular o comportamento de vilosidades coriônicas *in vitro*.

#### 4.2 Objetivos Específicos

I – Analisar a expressão gênica e proteica de fatores vasoativos (sFlt-1, PlGF), traçar o perfil de produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-12, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10) e a atividade metabólica de explantes vilosos de placentas saudáveis, tratadas com soro de gestantes com PE.

II – Analisar a expressão gênica e proteica de fatores vasoativos (sFlt-1, PlGF), traçar o perfil de produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-12, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10) e a atividade metabólica de explantes vilosos de placentas de gestantes com PE estimuladas com soro de gestantes saudáveis.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

## 5.1 Pacientes

As gestantes foram selecionadas a partir de mulheres que receberam atendimento pré-natal no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) junto ao Departamento de Obstetrícia e Ginecologia. Todo o procedimento foi submetido à apreciação das Comissões de Ética das Instituições envolvidas (ICB-USP e HC-FMUSP) e aprovado pelas mesmas. O consentimento prévio de cada gestante foi obtido para a participação no estudo. Os critérios de inclusão das gestantes em cada grupo foram estabelecidos a partir das seguintes condições:

*Grupo de gestantes pré-eclâmpticas:* O diagnóstico clínico para PE foi determinado pela manifestação de hipertensão arterial ( $\geq 140/90$  mm Hg) e proteinúria ( $\geq 300$  mg/24h). Foram selecionadas pacientes pré-eclâmpticas com idade gestacional entre 34-37 semanas.

*Grupo de gestantes saudáveis:* Foram selecionadas gestantes com ausência de doenças crônicas clinicamente diagnosticadas que poderiam predispor a gestante à PE (hipertensão, doença renal, obesidade, diabetes), não fumantes e que não faziam uso de álcool ou medicamentos de uso contínuo, com reações sorológicas negativas para HIV e sífilis, sem infecções clinicamente diagnosticadas e com pressão sanguínea  $\leq 140/90$  mm Hg e ausência de proteinúria.

## 5.2 Coleta de amostras de sangue e placenta

Após serem avaliadas pelo médico e diagnosticadas como pertencentes ao grupo de gestantes saudáveis (controle) ou com PE, foram obtidas das pacientes amostras de sangue antes do parto e fragmentos da placenta após a cesárea eletiva.

No momento do parto, antes da cesárea eletiva, foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubos contendo gel separador (BD Vacutainer® Venous Blood Collection). Ao término do procedimento cirúrgico, fragmentos da placenta foram obtidos e imediatamente colocados em Tubo Falcon (50 mL)

contendo tampão fosfato-salina (PBS 0,1M pH 7.4) e suplementado com 1% estreptomicina/penicilina, 0,5% gentamicina, 0,25% anfotericina B e 25 mM glicose. Nas dependências do laboratório, o tecido foi fragmentado e sucessivamente lavado em PBS estéril para remoção do sangue. Os fragmentos foram isolados e imediatamente utilizados para cultivo. O tubo contendo sangue foi centrifugado a 2000 x g por 30 minutos para separação do soro que foi alíquotado e mantido a -80 °C até o momento de sua utilização.

### **5.3 Obtenção das vilosidades coriônicas de placenta humana a termo e tratamento com o soro materno**

#### **5.3.1 Isolamento e cultivo de vilosidades coriônicas**

As vilosidades coriônicas terminais foram isoladas da placenta a termo com a ajuda de instrumentos cirúrgicos e de acordo com Aplin e colaboradores (1999). Resumidamente, os cotilédones placentários obtidos no centro cirúrgico foram exaustivamente lavados com solução salina gelada suplementado com 1 µL/mL penicilina, 1 µL/mL estreptomicina 100.000 UI, 1 µL/mL gentamicina 10.000 UI (Vitrocell-Embriolife, Campinas, SP, Brasil). Após, a região decidual da placenta foi removida para liberar as extremidades das vilosidades coriônicas. Sob estereó microscópio, as porções terminais das vilosidades foram dissecadas em PBS (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O vilão dissecado foi lavado com meio Hanks (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 1 µL/mL penicilina, 1 µL/mL estreptomicina 100.000 UI, 1 µL/mL gentamicina 10.000 UI e em seguida em meio DMEM F12 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) suplementado.

Para determinar a quantidade de vilosidades coriônicas plaqueadas por poço, foram pesados de 5 mg à 50 mg de tecido úmido e estes foram submetidos ao ensaio de viabilidade metabólica. O ponto no qual obtivemos maior quantidade de proteína e melhor viabilidade (30 mg), foi escolhido para realizar todos os experimentos. Após este procedimento, as vilosidades (30 mg de tecido úmido) foram plaqueadas em placa de cultura de 48 poços (TTP

Techno Plastics Products AG, Suíça) com meio de cultura D-MEM/F12 (1:1, v/v), suplementado com 1 µL/mL penicilina, 1 µL/mL estreptomicina 100.000 UI, 1 µL/mL gentamicina 10.000 UI, Insulina (100 u), MITOS, piruvato de sódio (56 ug/ml), Lactato de cálcio (520 ug/ml), BSA (albumina de soro bovino) 1% e 10% de soro bovino fetal. As vilosidades foram mantidas durante 24 horas a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> para estabilização.

### 5.3.2 Condições experimentais dos ensaios

De acordo com tratamento realizado, foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

- I) Explantes vilosos coriônicos de placentas de gestações normais (N-PL) tratados com soro de gestante saudável (N-S) (Controle saudável).
- II) Explantes de vilosidades coriônicas de placentas de gestações normais (N-PL) incubadas com soro de gestantes pré-eclâmpticas (PE-S) (Grupo experimental).
- III) Explantes de vilosidades coriônicas de placentas de gestações pré-eclâmpticas (PE-PL) tratadas com soro de gestantes pré-eclâmpticas (PE-S) (Controle PE).
- IV) Explantes de vilosidades coriônicas de placentas de gestações pré-eclâmpticas (PE-PL) incubadas com soro de gestantes saudáveis (N-S) (Grupo experimental).

### 5.3.3 Tratamento com soro materno de gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia

Ao término do período de estabilização, o meio foi removido e as vilosidades lavadas com PBS estéril aquecido à 37 °C. Meio DMEM/F12 igualmente suplementado, mas sem a adição de SBF foi inserido nas placas de cultura contendo as vilosidades. A este meio foi adicionado 10% de soro materno saudável ou pré-eclâmptico. As amostras permaneceram em cultivo por mais 24 e 48 horas a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de estímulo com o soro materno, o sobrenadante do cultivo foi coletado e armazenado para a avaliação de fatores produzidos durante o período, enquanto que as células foram coletadas para experimentos de expressão gênica e proteica. Parte das vilosidades coriônicas cultivadas e tratadas com soro materno também foram fixadas em METACARN para posterior análise morfológica.

#### **5.4 Ensaio de atividade metabólica utilizando MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium**

Para acessar a atividade metabólica celular das vilosidades, após o tratamento com o soro materno (saudável e PE) durante o período de 24 horas, foi realizado o ensaio de viabilidade metabólica utilizando como substrato o MTT (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) na concentração final de 5 mg/ml, preparado em PBS estéril e aplicado no cultivo celular por 90 minutos. Após este período, foi adicionado DMSO (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) às células para a liberação dos cristais de formazan produzidos (diretamente proporcional ao número de células viáveis). O sobrenadante resultante foi coletado para a medição da absorbância em 570 nm no SpectraMax Plus384 Absorbance Microplate Reader (Molecular Devices LLC, CA, USA) usando SoftMaxPro Software (Molecular Devices LLC, CA, USA).

#### **5.5 Caracterização morfológica dos explantes vilosos**

As amostras fixadas em METACARN seguiram os procedimentos rotineiros para inclusão em Histosec® (Merck, Darmstadt, Alemanha). Cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo Microm (Microm, Alemanha) e aderidos às lâminas de vidro tratadas com uma solução de Silane 1% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). Os cortes então foram submetidos à caracterização quanto à morfologia utilizando-se a técnica de coloração com hematoxilina-eosina.

### 5.5.1 HE e contagem de nós sinciciais

Para a análise morfológica, os explantes vilosos fixados foram processados para inclusão em parafina. Secções de 5 µm de espessura serão desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de etanol e sujeitas a coloração Hematoxilina-eosina (HE) e analisadas sob microscopia de luz convencional (Axioskop, Zeiss, Alemanha). Foram analisadas e quantificadas as alterações morfológicas promovidas pelo tratamento com o soro materno quanto a presença de nós sinciciais.

Os nós sinciciais foram contados em 10 quadrantes aleatórios de cada corte histológico no aumento de 200X. Foram analisadas 3 amostras por grupo experimental e controle, de pelo menos 3 experimentos distintos realizados em momentos diferentes. Os valores obtidos em cada experimento foram expressos como valores médios/área de vilos corionicos.

## 5.6 Análise de citocinas de perfil pró e anti-inflamatório por CBA

Os níveis de citocinas foram medidos em duplicata a partir de homogenato de vilosidades coriônicas utilizando *BD Cytometric Bead Array* (CBA) para um conjunto de proteínas humanas (BD CBA flex set, BD Biosciences, San Jose, CA). Foram analisadas as seguintes citocinas com seus respectivos limites de detecção: Interleucina-1β (IL-1β, 7,2 pg / mL); factor de necrose tumoral alfa (TNF-α, 3,7 pg / mL); IL-12p70 (1,9 pg / mL); IL-8 (3,6 pg / mL); IL-10 (3,3 pg / mL); e IL-6 (2,5 pg / mL). Resumidamente, as amostras foram imunoprecipitadas usando uma série de microesferas capturadas revestidas com anticorpos específicos contra cada citocina a serem avaliadas. Adicionaram-se então reagentes de detecção conjugados com ficoeritrina (PE) e a quantificação foi realizada por meio de um ensaio de citometria de fluxo. A aquisição de dados e as análises foram realizadas usando o citometro de fluxo LSR Fortessa TM (BD Biosciences, San Jose, CA) e BD CBA Analysis Software.

## 5.7 Análise do perfil de produção de sFlt-1 e PlGF placentários

### 5.7.1 Expressão proteica sFlt-1 e PlGF por Western Blot

Amostras de vilosidades coriônicas obtidas a partir de gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia cultivadas durante 24 horas após o tratamento com soro materno (controle e tratamento) foram lavadas em PBS 0,1 M e homogeneizadas em tampão RIPA (NP-40 a 1%, Na-desoxicolato a 0,25%, NaF 2 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, EDTA 1 mM e pH Tris-HCl 50 mM 7.4) com um coquetel de inibidores de fosfatase e protease (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) em tubos de contendo microesferas de cerâmica de 1,4 mm (MP Biomedicals, Alemanha) no homogeneizador de tecidos Precellys<sup>®</sup> (Bertin Corp., Rockville, EUA) a 11000 rpm por 15 min, a 4 °C. A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinchonínico (BCA Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, EUA).

Trinta  $\mu$ g de proteína total de cada amostra foi utilizado para a eletroforese em gel SDS-poliacrilamida à 15%, que foi sequencialmente transferido para uma membrana de nitrocelulose de 0,22 micras (Bio-Rad, CA, EUA). As membranas foram incubadas com 3% de leite seco sem gordura em solução de TBS com *Tween 20* (TBS-T) para bloquear a ligação não específica e subsequentemente, com: i) anticorpo monoclonal de coelho anti-sFlt-1 (Abcam, Y103, AB32152, que reconhece as isoformas solúveis de 77 kDa e 82 kDa; ii) anticorpo policlonal de coelho anti-PlGF (Abcam, AB9542), que reconhece as isoformas PlGF-1 (17 kDa-18k Da) e PlGF-2 (22 kDa-23 kDa). As amostras permaneceram *overnight*, a 4 °C. Foi então utilizado o anticorpo secundário cabra anti-IgG de coelho conjugado com HRP (KPL) por 1 h, a temperatura ambiente. A visualização das bandas reativas foi realizada com um sistema de quimioluminescência (Clarity Western ECL Substrato, Bio-Rad Laboratories, Inc Alemanha). Como controle endógeno, também foram avaliados os níveis de  $\beta$ -actina utilizando-se o anticorpo primário monoclonal produzido em coelho anti- $\beta$ -actina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), na diluição 1:5.000 e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:1000) conjugado a peroxidase. A intensidade da banda obtida pela quimiolumi-

nescência foi impressa em filme de raio-X, que foram escaneados em *Multifuncional Canon modelo Image Runner 1025iF* (Canon USA Inc, NY, USA). Em seguida, as bandas reativas ao anticorpo foram quantificadas com o auxílio do *software Image J* (NIH, Bethesda, USA) e os valores obtidos foram analisados utilizando-se o *software* GraphPad Prism versão 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As proporções foram calculadas usando  $\beta$ -actina como controle de carga e mostradas como unidades relativas (RU) em gráficos de barras.

### 5.7.2 Expressão proteica sFlt-1 e PlGF por ELISA

Os níveis de sFlt-1 e PlGF sérico, do homogenato placentário e sobrenadante do cultivo celular também foram medidos por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) usando Kits de ELISA específicos para VEGF R1 / Flt-1 e PlGF Quantikine (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

A absorbância foi determinada no leitor de microplacas SpectraMax Plus384 Absorbance Microplate Reader (Molecular Devices LLC, CA, USA) a 450 nm usando SoftMaxPro Software (Molecular Devices LLC, CA, USA). Os valores de citocinas foram expressos em pg/mL de acordo com o que foi calculado a partir das curvas padrão.

### 5.8 Expressão gênica de sFlt-1 e PlGF

O RNA total foi extraído de vilosidades cultivadas usando o Kit RNA Pure Link (Ambion, Life Technologies, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. A concentração de RNA e a pureza foram medidas usando um espectrofotômetro Nano Drop ND 1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware). O RNA foi tratado com enzima DNase I de amplificação (Invitrogen, Carlsbad, CA) para eliminar o DNA genômico contaminante e as reações de transcrição reversa foram preparadas com reagentes do Kit de Transcrição Reversa de cDNA *High Capacity* (Applied Biosystems, Foster City, CA). As reações foram então preparadas com Power UP SYBR Green PCR Master

Mix™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se os seguintes *primers* iniciadores específicos para sFLT1 (NM\_001159920.1 - sense: AGAGGTGAGCACTGCAACAA, anti-sense GTGGTACAATCATTCCCTTGTGCT), PIGF (NM\_002632.5 - Sense: GTCACCATGCAGCTCCTAAA, anti-sense: CCTTTCCGGCTTCATCTTCT) e YWHAZ (sense: GCCACAATGTTCTTGGCCCATCAT, anti-sense: TGGTTGGTGAC A A GACAGAAGGCT) com um volume final de 12 µL. A amplificação por reações de PCR foram realizadas em triplicadas usando o sistema de PCR em tempo real Step One Plus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA), com as seguintes condições de ciclo térmico: desnaturação inicial - 95 ° C durante 10 min., 40 ciclos de 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 1 min. mais 95 ° C por 30 s. Eletforese em gel de agarose dos produtos amplificados foi realizada para verificar o tamanho do amplicon (dados não mostrados).

## 5.9 Análise estatística

Teste *t* de *Student* foi realizado para comparar padrões entre o grupo de gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia. Para todas as análises,  $p < 0,05$  derivado de um teste de duas colunas foi considerado significativo. Para as comparações dos níveis de citocinas foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Graph Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA).

## **6. RESULTADOS**

## 6.1 Características clínicas das gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia

As análises dos perfis clínico e demográfico de cada grupo selecionado para o presente estudo estão relacionadas na tabela 1.

	Saudável (n=19)	Pré-eclâmpsia (n=6)
<b>Idade materna</b>	30,41 ± 6,08	29,50 ± 6,61
<b>IG (sem) no momento do parto</b>	38,93 ± 0,46	35,14 ± 1,68*
<b>Gravidade</b>	3,14 ± 1,13	1,29 ± 0,49*
<b>Paridade</b>	1,97 ± 1,07	0,57 ± 0,83*
<b>Peso RN (Kg)</b>	3,14 ± 0,24	1,72 ± 0,82*
<b>Peso placenta (g)</b>	457, 67 ± 66	349,25 ± 162,19
<b>Pressão sanguínea sistólica (mmHg)</b>	122,78 ± 14,27	146,33 ± 12,30*
<b>Pressão sanguínea diastólica (mmHg)</b>	70,45 ± 17,12	94,50 ± 7,99*
<b>PTU (g/L 24h)</b>	N/D	2,89 ± 0,35
<b>PTU por volume &lt; 0,15 g/v 24h</b>	N/D	4,66 ± 3,33

**Tabela 1.** Características clínicas das gestantes. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, seguido por análise estatística utilizando-se *Student t' test* (\*p<0,001). (N/D - Não Determinado).

Conforme pode ser observado na Tabela 1, as gestantes saudáveis e com pré-eclâmpsia possuem aproximadamente a mesma idade no momento do parto, entre 27 e 30 anos. O parto ocorreu por volta da 39ª semana de gestação no grupo de gestantes saudáveis, enquanto que no grupo de mulheres com pré-eclâmpsia, devido ao quadro clínico, ocorreu mais precocemente, por volta de 35 semanas (p<0,001). O grupo de mulheres com pré-eclâmpsia também apresentou menor número de gestações anteriores e nascimentos realizados em comparação com mulheres grávidas normais, o que significa que foram principalmente primigestas

Os recém-nascidos do grupo de mulheres com pré-eclâmpsia foram significativamente menores do que os de gestações saudáveis ( $p < 0,001$ ). No entanto, apenas um neonato deste grupo foi considerado com restrição do crescimento fetal. Os demais, apesar do peso diminuído, se encontravam dentro da curva de normalidade para a idade gestacional. Em relação à placenta, não foram encontradas diferenças de peso entre os grupos analisados.

As gestantes com pré-eclâmpsia apresentaram pressão arterial sistólica e diastólica maior em relação às gestantes saudáveis ( $p < 0,001$ ) assim como níveis elevados de proteinúria (níveis medidos apenas nas mulheres grávidas com pré-eclâmpsia).

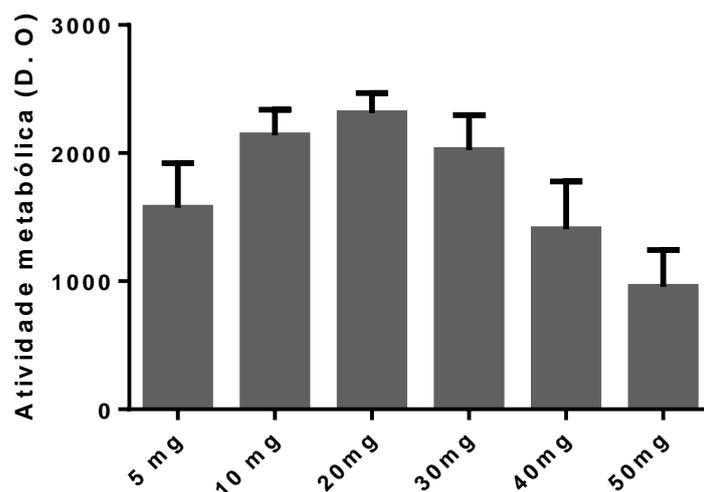
## 6.2 Atividade metabólica dos explantes placentários tratados com soro materno

A viabilidade dos explantes placentários (Figura 1) foi medida após o tratamento com soro materno utilizando o ensaio MTT.



**Figura 1.** Fotomicrografia representativa de uma vilosidade coriônica isolada de placenta a termo de gestante saudável. Imagem capturada em estéreo microscópio imediatamente após a coleta e dissecção (10X).

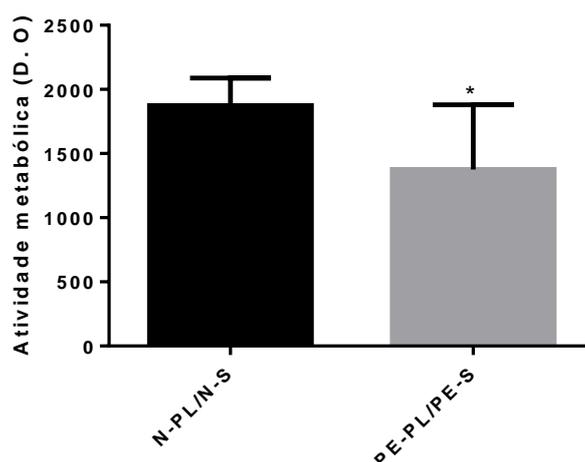
Primeiramente, para estabelecer a quantidade adequada de explantes necessários para o experimento, grupos de vilos foram pesados e submetidos a ensaios para avaliação da atividade metabólica (ponto zero). A curva (Figura 2) tem início com 5 mg e atinge 50 mg de tecido úmido (realizados em triplicata).



**Figura 2.** Atividade metabólica de vilosidades coriônicas obtidas de placentas saudáveis por miligrama de tecido úmido (n=3) medida pelo ensaio de MTT imediatamente após a coleta (ponto zero). Valores representados em densidade ótica (D.O.).

Para os experimentos que se sucederam, utilizamos então a média dos valores de maior viabilidade metabólica (2022,50) e, que culminaram com o peso de 30 mg de tecido.

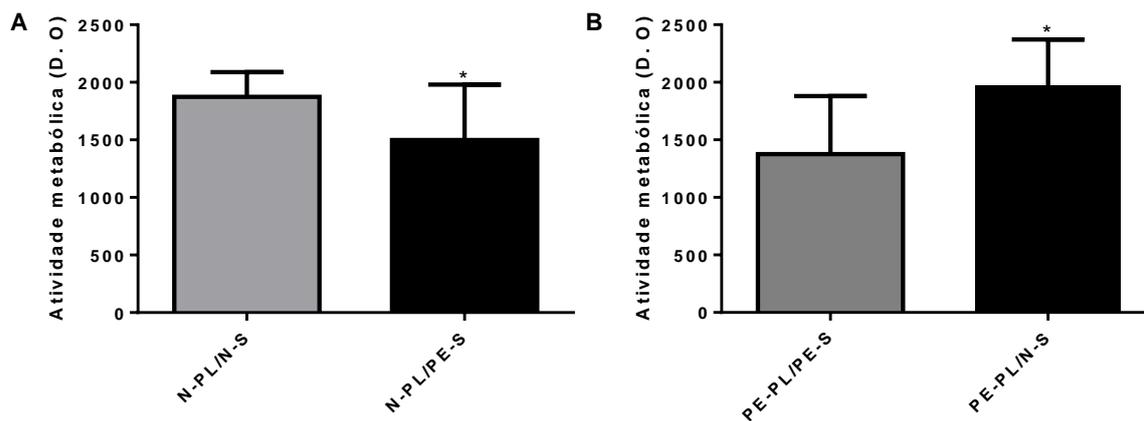
Experimentos similares foram realizados utilizando vilos coriônicos extraídos de placentas de gestações saudáveis (N-PL) e de gestações com PE (PE-PL) e cultivados com 10% do *pool* de soro materno correspondente (N-S e PE-S, respectivamente; Figura 3).



**Figura 3.** Atividade metabólica de vilosidades coriônicas obtidas de placentas saudáveis (N-PL) cultivadas com soro materno saudável (N-S) e obtidas de gestações com PE (PE-PL) cultivadas com soro de mulheres com PE (PE-S), após o período de estabilização de 3 horas em condições de cultivo (5% CO<sub>2</sub> a 37 °C). (n=3 e n=2; respectivamente). \*p<0,05, teste *t* de Student.

Conforme pode ser observado na Figura 3, a viabilidade metabólica dos explantes placentários pré-eclâmpticos é significativamente menor em comparação aos explantes de placentas saudáveis (p=0,003). Este padrão está de acordo com o que é descrito na literatura para a patofisiologia da doença e era uma condição esperada para a validação dos tratamentos.

Após 24 horas em cultivo com soro materno, no entanto, observamos alterações em relação em relação a este perfil (Figura 4). A administração do *pool* de soro PE em vilosidades saudáveis diminuiu significativamente a viabilidade metabólica dos vilos coriônica após 24 horas de cultivo (Figura 4A). A administração do *pool* de soros saudáveis ao contrário restaurou os níveis de viabilidade metabólica das vilosidades PE a valores próximos dos observados em placentas saudáveis (Figura 4B).

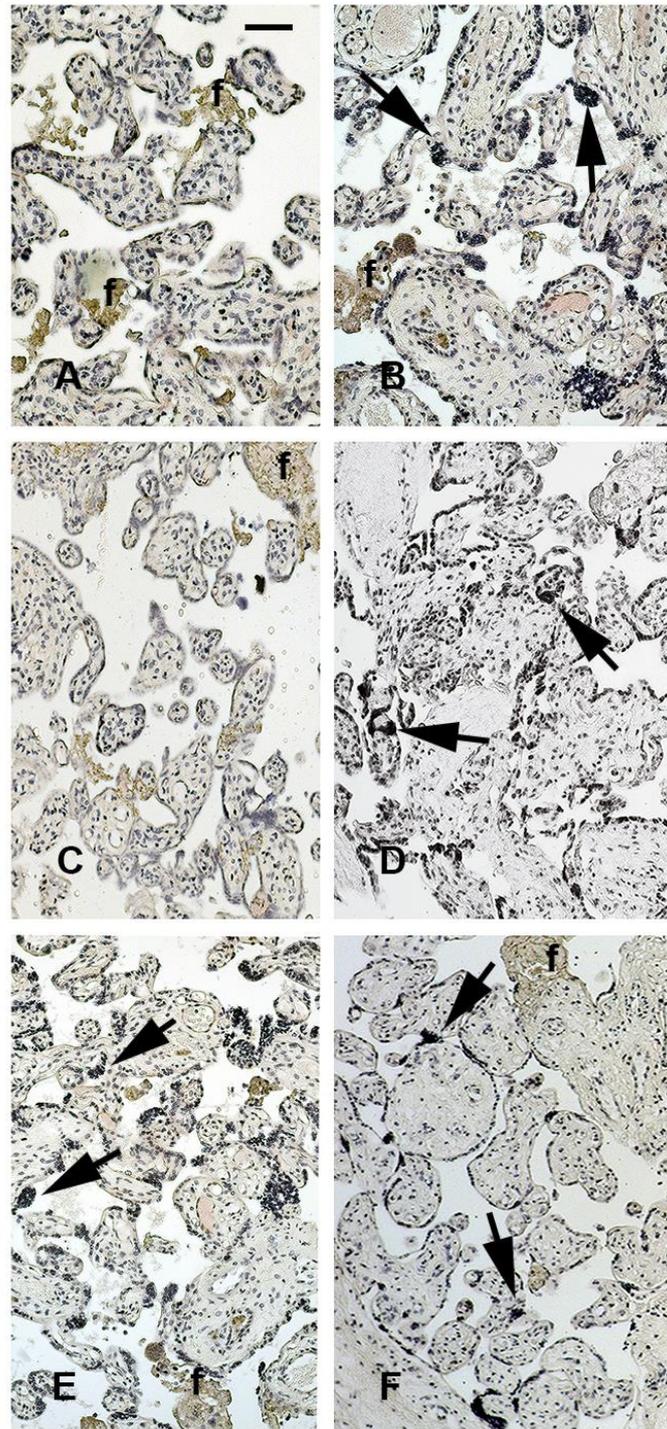


**Figura 4.** Atividade metabólica das vilosidades coriônicas cultivadas por 24 horas em diferentes condições experimentais. **A.** Placenta saudável (N-PL) cultivada com soro materno saudável (N-S) e soro de gestações pré-eclâmpticas (PE-S) ( $n=3$ ;  $*p=0,012$ ). **B.** Vilos coriônicos de placentas de gestações pré-eclâmpticas (PL-PE) cultivadas com materno pré-eclâmptico (PE-S) e saudável (N-S) ( $n=5$ ;  $*p=0,004$ ) Teste *t* de Student.

### 6.3 Caracterização morfológica e histoquímica dos explantes vilosos

#### 6.3.1 Nós sinciciais

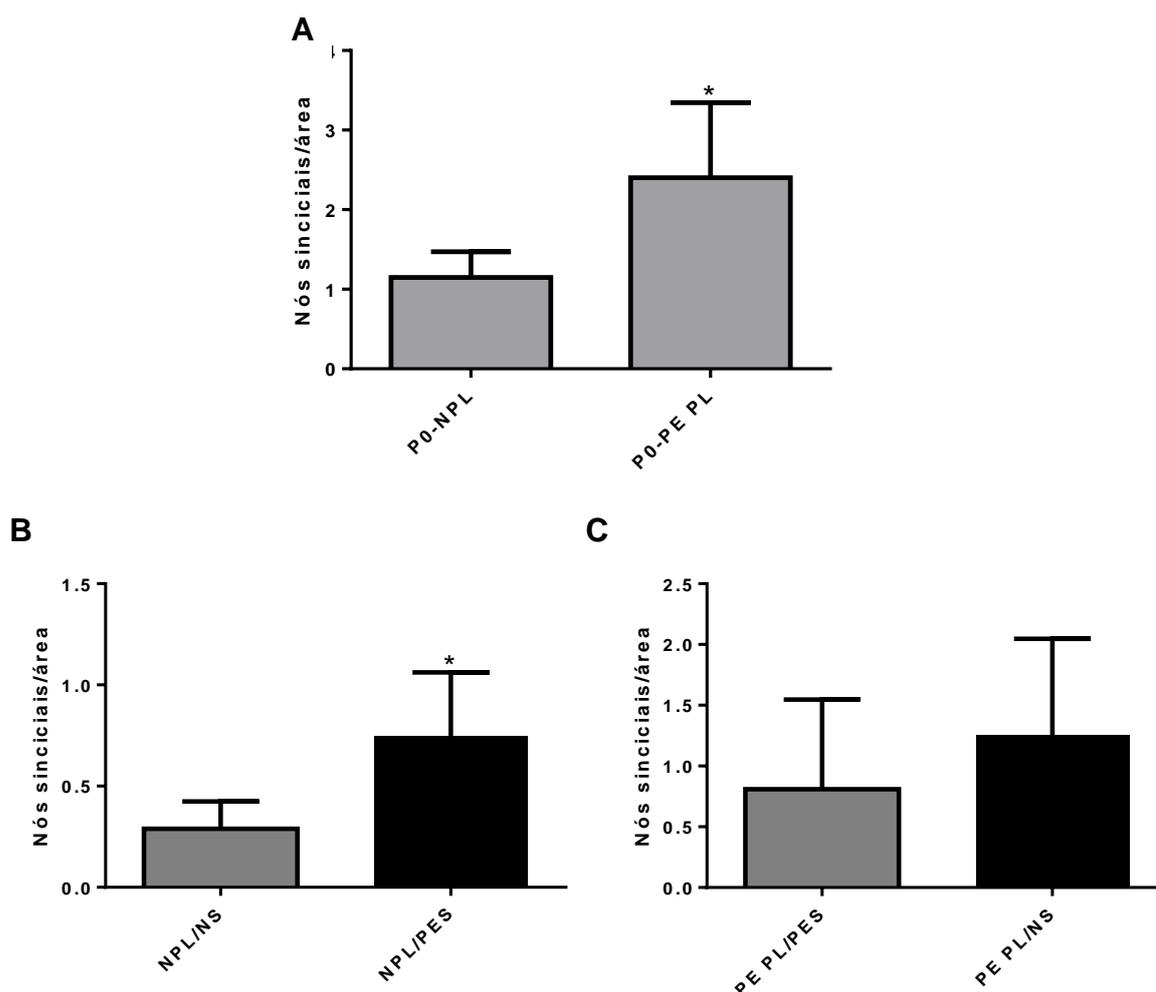
Como esperado, a análise histológica dos vilos coriônicos de gestantes saudáveis não mostrou alterações relevantes. Os vilos eram formados por um eixo de tecido mesenquimal com células mesenquimais, macrófagos e capilares, revestido pelo sinciciotrofoblasto. Ocasionalmente material fibrinoide era encontrado assim como nós sinciciais (Figura 5A). As placentas de pacientes com pré-eclâmpsia, mostraram estrutura e organização semelhante, com uma aparente maior quantidade de nós sinciciais, o que se confirmou nas análises quantitativas realizadas (Figura 6A). Os vilos cultivados mantiveram sua organização, onde a presença de todos os componentes celulares vilosos foi observada (Figuras 5C-F).



**Figura 5.** Fotomicrografia de vilos coriônicos obtidos de placenta humana a termo corada por HE. As figuras **A** e **B** representam vilos recém coletados (ponto 0) de placentas de gestantes saudáveis e com preeclâmpsia, respectivamente. As figuras **C** e **D** são imagens representativas de vilos de placentas saudáveis cultivados por 24 h com soro de gestante saudável (**C**) e com soro de gestantes com pré-eclâmpsia (**D**). As figuras **E** e **F** representam vilos de gestantes com pré-eclâmpsia cultivados com soro de gestantes com PE (**E**) e de gestantes saudáveis (**F**). Setas indicam nós sinciciais. Coloração: H-E. A barra em **A** representa 50  $\mu$ m em todas as fotomicrografias.

As placentas de gestantes com PE apresentam maior quantidade de nós sinciciais quando comparadas às placentas de gestantes saudáveis ( $p=0,036$ ) no momento da coleta (ponto zero, Figuras 6A).

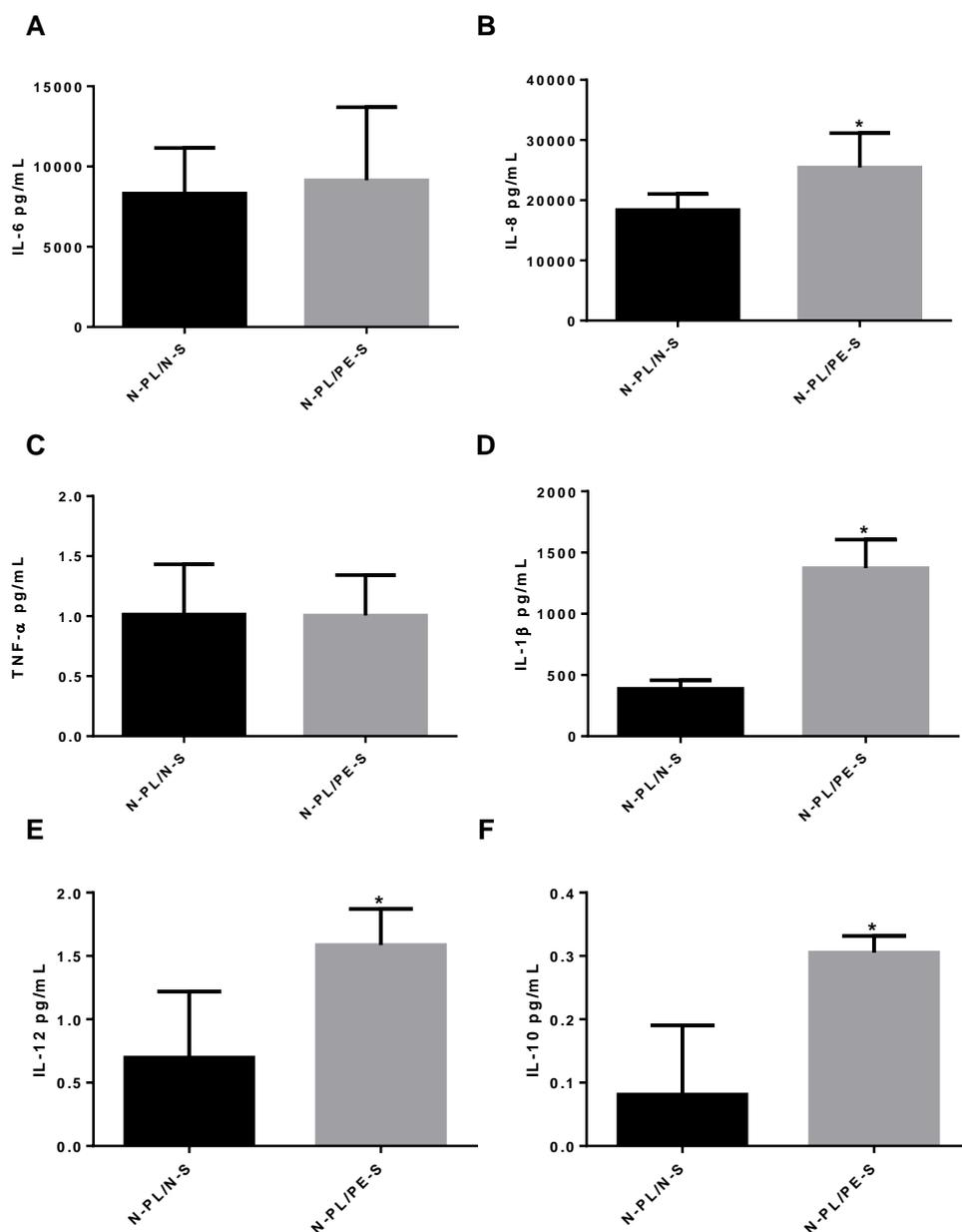
Após o tratamento com o soro materno de gestantes com PE (Figuras 6B), foi observado um aumento na contagem de nós sinciciais em vilosidades de placenta das gestantes saudáveis ( $p=0,014$ ). Em vilosidades das placentas de gestantes com PE (Figura 6C), no entanto, não foram observadas diferenças significativas na contagem de nós sinciciais ( $p=0,275$ ).



**Figura 6.** Contagem de nós sinciciais em placentas de gestantes saudáveis (NPL) e com pré-eclâmpsia (PE PL). **(A)** Amostras mensuradas no ponto 0 (amostras fixadas imediatamente após a coleta). **(B)** Placenta saudável (N-PL) após 24 horas de cultivo com soro materno saudável (N-S; controle) e pré-eclâmptico (PE-S; tratado) ( $n=2$ ). **(C)** Placenta pré-eclâmptica (PL-PE) após 24 horas de cultivo com soro materno pré-eclâmptico (PE-S; controle) e saudável (N-S) ( $n=3$ ). Os valores médios foram comparados pelo teste *t* de Student. \* $p<0,05$ .

#### **6.4 Análises de citocinas de perfil pró e anti-inflamatório**

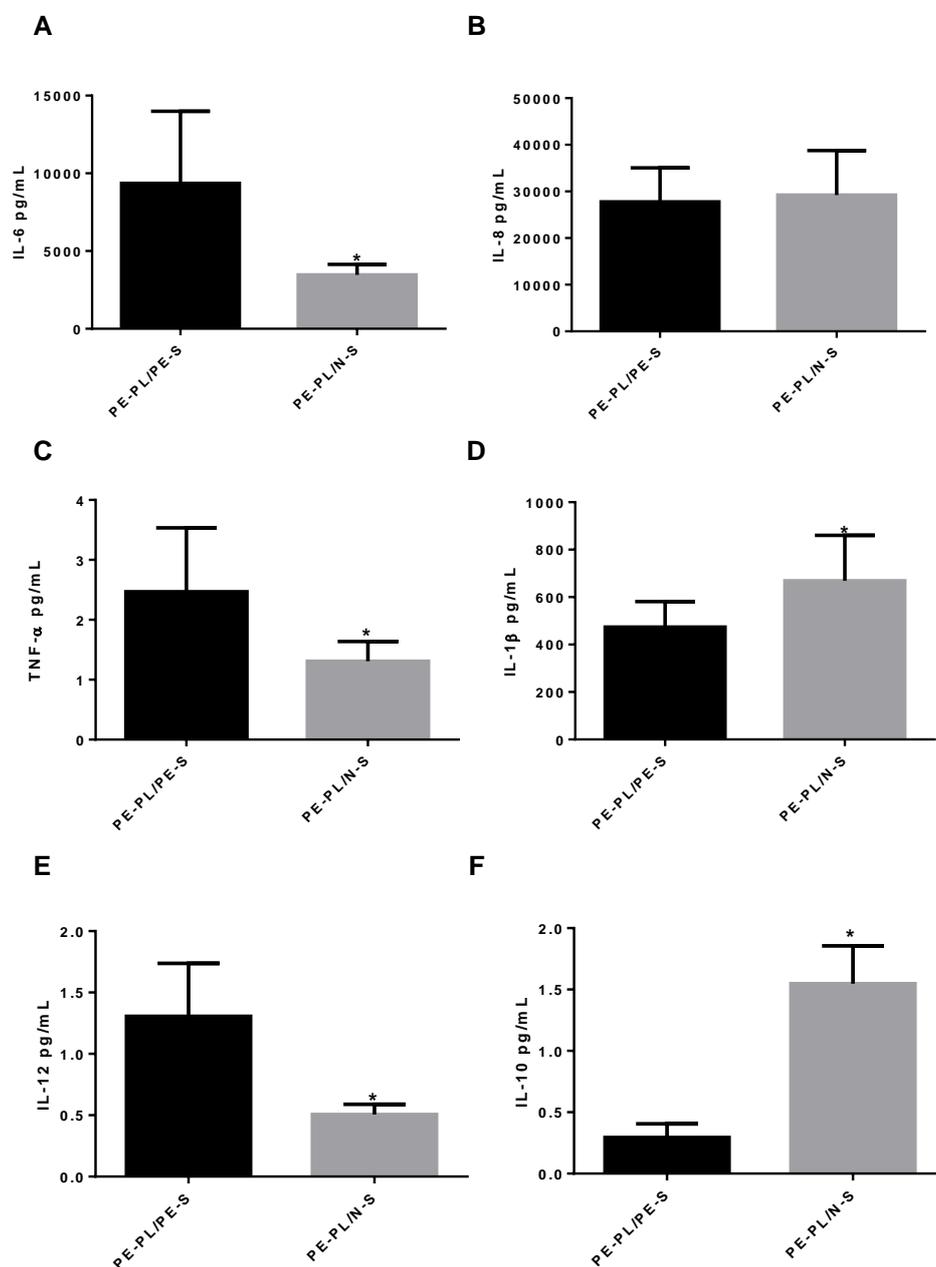
O perfil de citocinas (inflamatórias IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a citocina reguladora IL-10) foi avaliado nos homogenatos de amostras placentárias após 24h de cultura. O perfil de citocinas em placentas saudáveis tratadas com soro de PE não se alterou no que se referiu aos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  (Figuras 7A e C). A produção de IL-8, IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-10 foram maiores nas amostras placentárias tratadas com soro de PE do que nas tratadas com soro de mães saudáveis (Figuras 7B e D-F,  $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Perfil de citocinas em amostras de explantes placentários de mulheres saudáveis (N-PL) tratadas com soro PE (PE-S) e comparadas aos seus respectivos controles tratados com soro normal (N-S). Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0.05$ , Teste *t* de Student ( $n=3$ ).

Os níveis da citocina IL-8 O em placentas de PE não se alterou após o tratamento dos vilos com soro normal (Figura 8B,  $p = 0,397$ ). Já os níveis de IL-1 $\beta$  (Figura 8D,  $p = 0,046$ ) e IL-10 (Figura 8F,  $p = 0,01$ ) mostraram concentrações aumentadas. Os níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 diminuíram após

o tratamento (Figura 8A,  $p = 0,04$ , 8C,  $p = 0,03$  e 8E,  $p = 0,040$ , respectivamente).

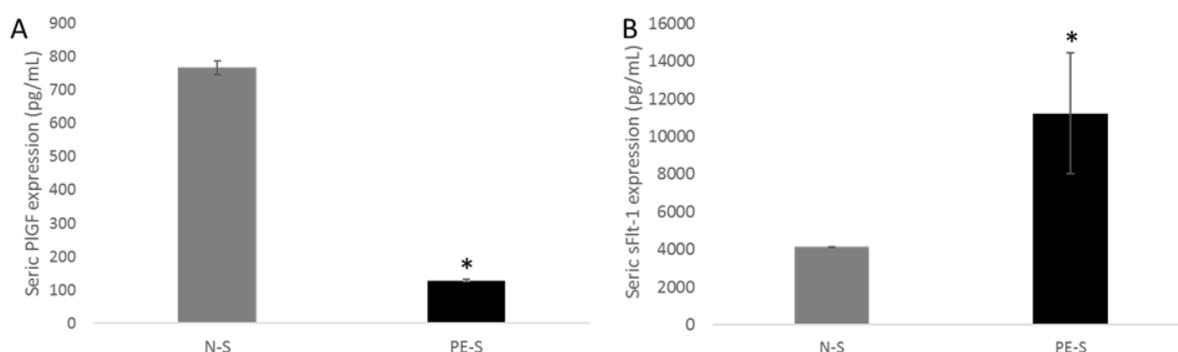


**Figura 8.** Perfil de citocinas em amostras de explantes placentários de mulheres com PE (PE-PL) tratadas com soro saudável (N-S) em relação aos seus respectivos controles tratados com soro PE (PE-S). Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0.05$ , Teste *t* de Student ( $n=3$ ).

## 6.5 Produção de sFlt-1 e PIGF pelos vilos corionicos cultivados

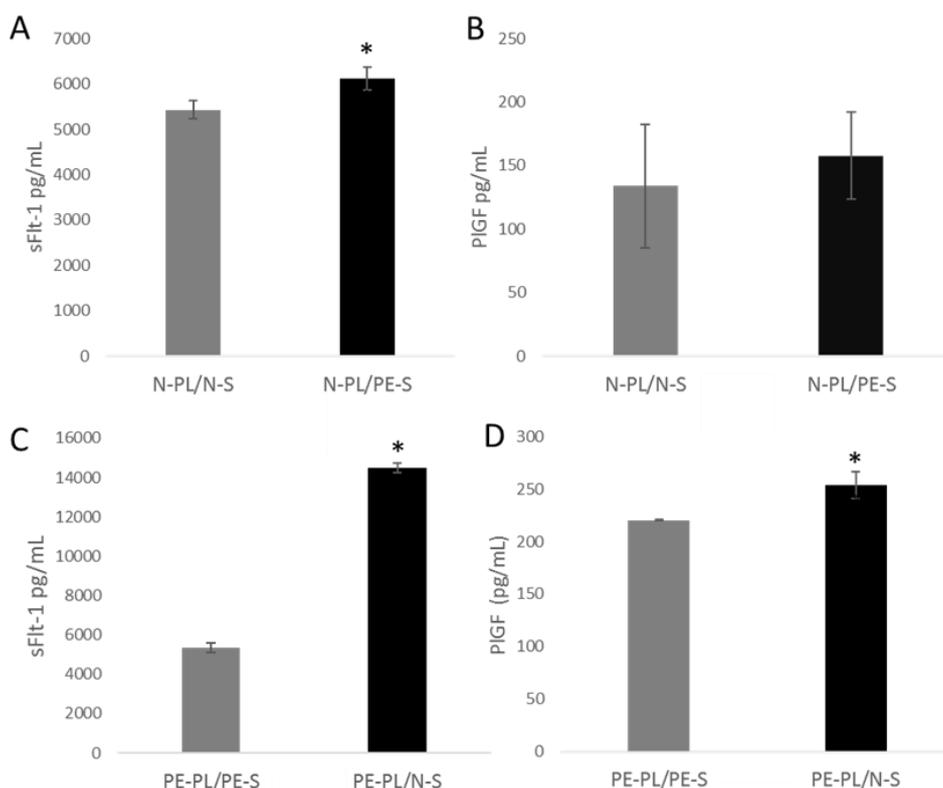
### 6.5.1 Realização dos ensaios de expressão proteica - ELISA

Os níveis de *sFlt-1* e *PLGF* foram medidos através de ELISA no soro das gestantes saudáveis e com PE (Figura 9). Como esperado os níveis de *PLGF* mostraram-se significativamente diminuídos nas pacientes com PE ( $p < 0,0001$ ) enquanto que os de *sFlt-1* mostraram-se aumentados ( $p = 0,009$ ).



**Figura 9.** Análise da expressão sérica de sFlt-1 e PIGF em mulheres saudáveis (N-S) e com pré-eclâmpsia (PE-S). Teste *t* de Student, \* $p < 0,01$ .  $n = 4$ .

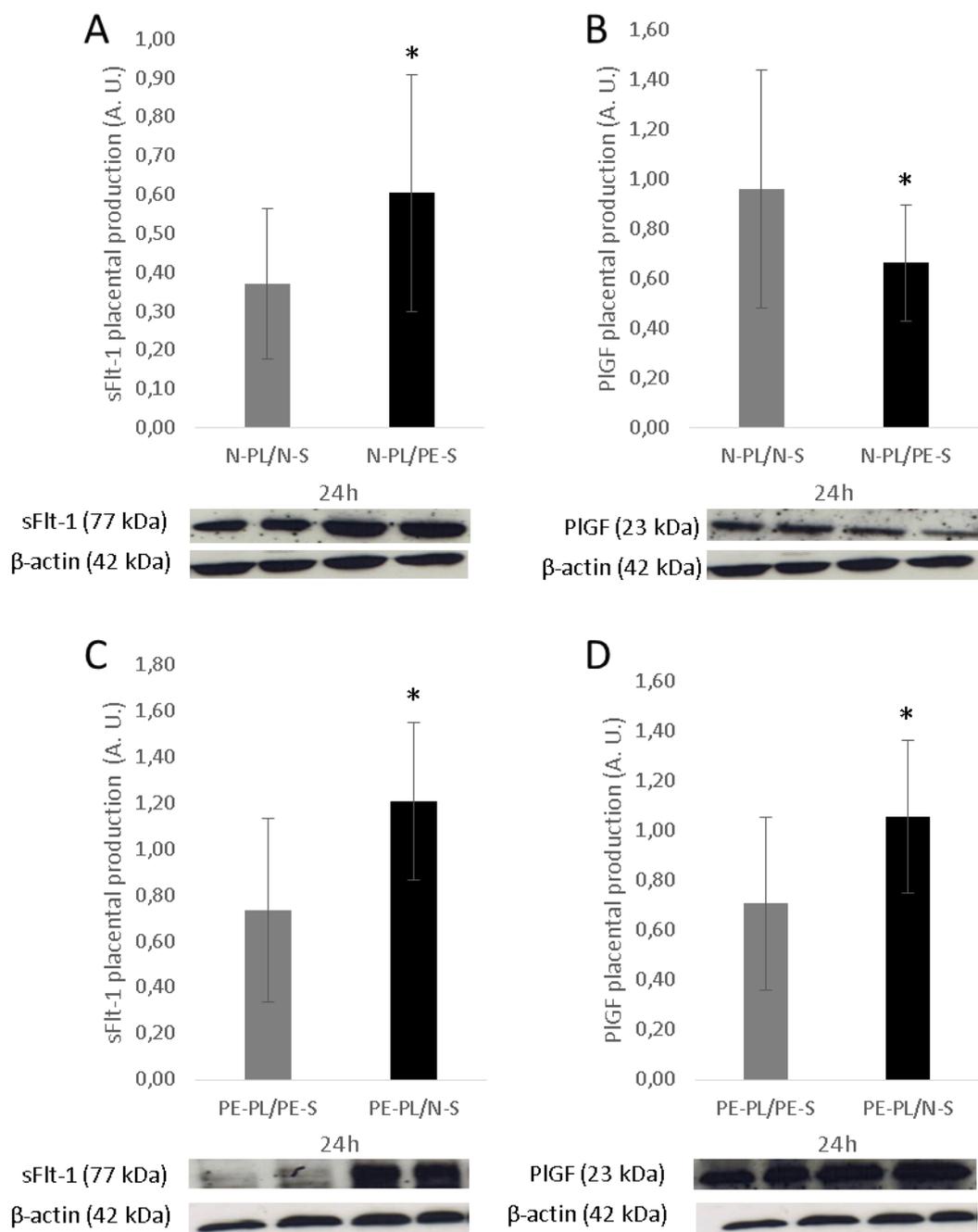
A expressão protéica para sFlt-1 e PIGF também foi realizada em lisado placentário após 24 horas de cultivo com o soro materno. sFlt-1 aumentou nos homogenatos placentários tratados com soro de PE (Figura 10A,  $p = 0,02$ ), enquanto que os níveis de *PLGF* não mostraram alterações significativas (Figura 10B,  $p = 0,264$ ). Quando as vilosidades placentárias obtidas de pacientes com PE foram expostas ao soro de gestantes saudáveis, ambos, sFlt-1 e PIGF, mostraram-se aumentados nos homogenatos vilosos (Figura 10C,  $p = 0,001$ , Figura 10D,  $p = 0,01$ ).



**Figura 10.** Análise da expressão protéica dos fatores vasoativos sFlt-1 (A - C) e PIGF (B - D) obtida por ELISA de vilos corionicos cultivados por 24 h. Os resultados obtidos dos explantes placentários de mulheres saudáveis (N-PL) tratados com soro PE (PE-S) e de gestantes com PE (PE-PL) tratados com soro saudável (N-S) foram comparados aos seus respectivos controles (N-PL/N-S e PE-PL/PE-S, respectivamente). \* $p < 0.05$ , Teste *t Student*.  $n = 4$ .

### 6.5.2 Realização dos ensaios de expressão protéica – Western Blotting

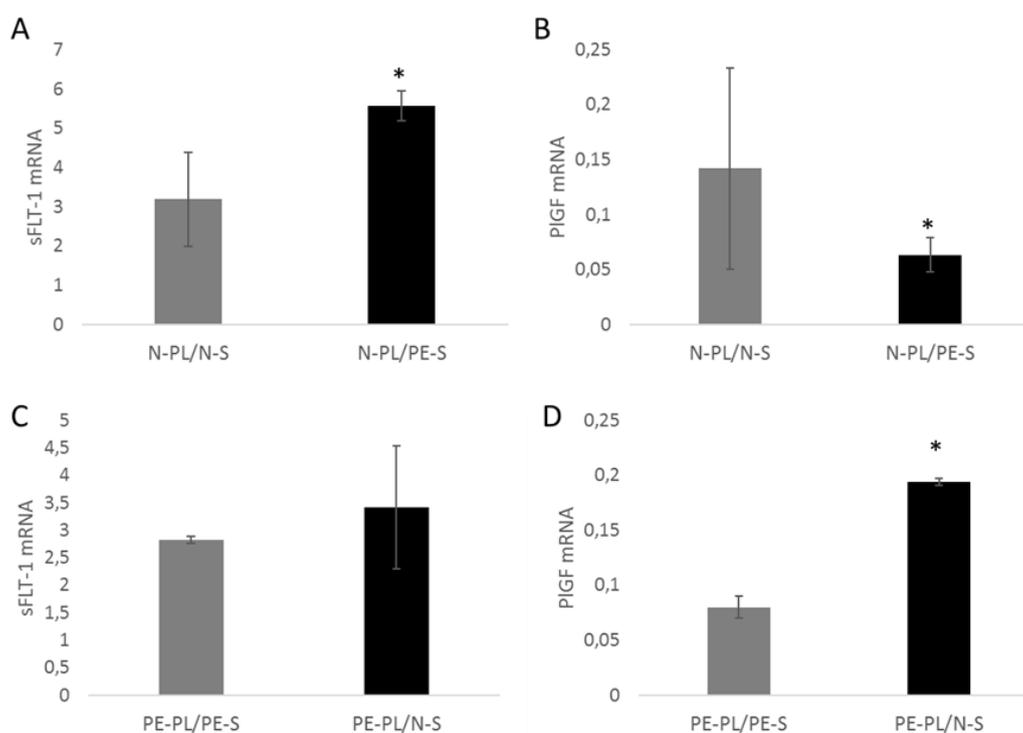
Os níveis totais de proteínas placentárias sFlt-1 e PIGF foram também medidos por *Western Blotting* (Figura 11). Os explantes de gestantes saudáveis tratadas com soro PE mostraram aumento significativo de sFlt-1 ( $p = 0.008$ , Figura 11A) e diminuição dos níveis de PIGF ( $p = 0.04$ , Figura 11B). Em explantes de placenta de mulheres com PE, o soro saudável promoveu tanto o aumento de sFlt-1 ( $p = 0.01$ , Figura 11C) quanto o de PIGF ( $p = 0.04$ , Figura 11D).



**Figura 11.** Análise da expressão protéica dos fatores vasoativos sFlt-1 (A - C) e PlGF (B - D) obtida por *Western Blotting*. Explantes placentários de mulheres saudáveis (N-PL) tratadas com soro PE (PE-S) foram comparadas aos seus respectivos controles tratados com soro normal (N-S), e explantes de placentas PE (PE-PL) tratados com soro saudável (N-S) comparados com seu controle tratado com soro PE (PE-S). \* $p < 0,05$ , Teste *t de Student*.  $n = 4$ .

### 6.5.3 Realização dos ensaios de expressão gênica

A expressão de mRNA de *sFlt-1* (Figura 12A e C) e *PLGF* (Figura 12B e D) foi avaliada através de ensaios RT-qPCR em gestantes saudáveis e com PE para determinar a influência do tratamento sobre a expressão gênica nos diferentes grupos experimentais. Quando tratadas com soro de PE, placentas saudáveis exibiram valores mais elevados de *sFlt-1* (Figura 12A,  $p = 0,005$ ) e menores de *PLGF* (Figura 12B,  $p = 0,03$ ) em comparação com placentas saudáveis tratadas com soro de mulheres saudáveis. Em contraste, níveis de *PLGF* aumentados foram observados em placentas de gestantes com PE (Figura 12D,  $p < 0,001$ ) expostos a soro normal. Não foram detectadas alterações nos níveis de *sFlt-1* (Figura 12C,  $p = 0,234$ ).



**Figura 12.** Análise da expressão gênica dos fatores vasoativos sFlt-1 (A - C) e PLGF (B - D) por RT-qPCR. Explantes placentários de mulheres saudáveis (N-PL) tratadas com soro PE (PE-S) foram comparadas aos seus respectivos controles tratados com soro normal (N-S), e explantes de placentas PE (PE-PL) tratados com soro saudável (N-S) comparados com seu controle tratado com soro PE (PE-S). O transcrito para *sFLT1* e *PLGF* foram quantificados por RT-qPCR, normalizados em relação ao endógeno *YWHAZ* como controle constitutivo. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0.05$ , Teste t de Student ( $n=4$ ).

## **7. DISCUSSÃO**

. O termo “eclampsia” tem origem grega e significa, em tradução literal, “raios luminosos”, fazendo relação com os distúrbios visuais que algumas gestantes apresentavam antes das convulsões. As primeiras observações em relação a estes sintomas característicos datam de aproximadamente 400 anos a.C. realizadas por Hipócrates, que ao descrever o quadro que se instalava nesta condição, atribuiu um mal prognóstico tanto para a mãe quanto para o bebê. Esse termo foi, então, empregado para definir as ocorrências de convulsões em mulheres durante a gestação. No final do século XIX, observou-se que este grupo também apresentava uma aparência edematosa, o que se assemelhava a de indivíduos com insuficiência renal crônica. Com isso, passou-se a analisar a presença de proteína na urina de gestantes eclâmpticas. Paralelamente a P.A. medida neste grupo de mulheres eclâmpticas também apresentou valores elevados e foi observado que essas características poderiam manifestar-se antes mesmo das convulsões, dando origem então ao termo Pré-eclâmpsia (PE). A observação de que mesmo sem as convulsões, algumas gestantes que apresentavam proteinúria e hipertensão tinham comprometimento progressivo da gestação e que isso poderia acarretar na morte materna e fetal fez com que a PE fosse considerada como uma doença única e incluída no ramo da medicina obstétrica (MYATT; ROBERTS, 2015).

Desde as primeiras observações, foram elaboradas teorias sobre sua origem, métodos de diagnóstico, tratamentos, possíveis marcadores, mas o fato é que até os dias de hoje, a patogênese da PE continua desconhecida. Apesar dos muitos estudos sobre a disfunção vascular (pressão arterial) e renal (proteinúria) na PE, o envolvimento de diversos outros sistemas, como o de coagulação (LOKKI et al., 2014), o hepático (ESCOBAR et al., 2018) e o cerebral (IJOMONE et al., 2018), também têm sido cogitados.

Também existem dados robustos relacionando o surgimento da PE a uma possível disfunção trofoblástica e ao desenvolvimento inadequado da placenta. No entanto, tendo em vista o contexto no qual a PE se desenvolve, associada a sua natureza multifatorial e heterogênea, é possível que a condição materna exerça influência no microambiente placentário, modificando a resposta celular e colaborando na manifestação clínica dos sintomas. Neste

contexto, propusemos um estudo no qual poderíamos observar o compartimento placentário pré-eclâmtico em um ambiente saudável (ambiente livre dos fatores relacionados à PE) e, inversamente, o compartimento placentário saudável em um ambiente pré-eclâmtico. Nesse estudo foi analisada a viabilidade metabólica, o perfil de produção de citocinas produzidas por estes vilos coriônicos e a expressão de fatores vasoativos como o fator de crescimento placentário (PIGF) e o receptor solúvel de VEGF (sFlt-1).

### **7.1 Características das gestantes selecionadas para esse estudo**

As gestantes selecionadas para o grupo PE apresentaram aumento de pressão arterial e elevados níveis de proteinúria em relação ao grupo de gestantes saudáveis. Em sua maioria são primigestas e realizaram o parto mais precocemente (35 semanas). As características clínico-laboratoriais dos grupos estudados corroboram dados da literatura e confirmam as diferenças esperadas entre os pacientes pré-eclâmticas e o grupo controle quanto à idade gestacional, pressão arterial sistólica e diastólica, proteinúria e peso do recém-nascido (CINCOTTA; BRENNECKE, 1998; ACOG, 2013; BARTSCH, et al., 2016).

Sabe-se que o diagnóstico precoce e tratamento adequado da PE pode melhorar o prognóstico materno e fetal (SALEH, et al., 2017; SABRIÀ, et al., 2018), sendo assim, muitos esforços tem sido empregados na identificação de marcadores plasmáticos e estudos de imagem no início da gestação. No entanto, o mais promissor dos métodos de escaneamento parece ser a combinação entre sFlt-1 e PIGF com alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico e prognóstico da PE (RANA et al., 2019). Em mulheres que desenvolvem PE, essa relação é caracterizada por um excesso de sFlt-1 com uma deficiência simultânea em PIGF. Um critério atualmente sendo avaliado estipula um valor  $\geq 38$  pg/mL na relação sFlt-1/PIGF como limítrofe para identificar gestantes que possuem risco de desenvolver PE (DRAGAN, et al. 2017). Quanto maior o valor encontrado para essa relação pior é o prognóstico da doença (HERRAIZ, et al., 2018). Utilizando esta referência na análise de 550 mulheres durante a primeira consulta pré-natal e com fatores de risco para

o desenvolvimento da PE, Zeisler e colaboradores (2019) descartaram o risco para o desenvolvimento da PE entre 2 e 3 semanas de gestação com valores preditivos negativos (VPN) de 97,9% e 95,7%, respectivamente. A partir da 4ª semana de gestação, o risco foi descartado com um VPN elevado (94,3%) e alta sensibilidade e especificidade (66,2% e 83,1%, respectivamente). Existem também evidências de que estes níveis alterados de sFlt-1 e PIGF precedem a manifestação clínica dos sintomas e a relação entre estes dois marcadores poderia auxiliar os especialistas clínicos a distinguir gestantes que, ao manifestarem as primeiras desordens hipertensivas, poderiam desenvolver PE ou não.

A relação entre sFlt-1/PIGF realizada a partir das análises séricas das gestantes selecionadas para o presente estudo, apresentou perfil semelhante ao descrito por Zeisler e colaboradores (2019), apresentando valores médios de 58,65 em comparação ao grupo de gestante saudável, que apresentou valor médio nesta relação de 5,40, o que reforça a seleção das gestantes utilizadas neste estudo.

## **7.2 O efeito do ambiente sobre a atividade metabólica dos vilos e do sinciciotrofoblasto**

Ocupando uma posição estratégica, o sinciciotrofoblasto, formado pela fusão das células do citotrofoblasto (BENIRSCHKE et al., 2006), se mantém em contato com o sangue materno. Esta localização, embora essencial para a nutrição fetal, também o coloca em uma condição de permanente exposição aos fatores presentes no sangue materno, sejam eles metabólicos (aumento de glicose, por exemplo), xenobióticos, patogênicos ou mesmo de natureza biológica, mas em concentração ou em combinações atípicas para a homeostasia celular. Evidências mostram que o sinciciotrofoblasto, dentro de limites cabíveis, é capaz de modular suas atividades funcionais garantindo a progressão e o sucesso da gestação. No entanto, a identificação de sinais desta exposição que possam levar a injúrias nesta camada e diminuição de sua atividade funcional é um aspecto-chave para a compreensão da qualidade gestacional em, sobretudo, fetal.

Em nossos ensaios, para avaliarmos uma possível ação direta do soro das pacientes sobre estas estruturas, avaliamos a atividade metabólica das células dos explantes coriônicos, por meio de ensaios com MTT. Este ensaio mede a atividade de clivagem enzimática do composto de tetrazólio em cristais de formazan insolúveis em água por desidrogenases presentes principalmente nas mitocôndrias de células vivas. Desta forma, trata-se de um ensaio colorimétrico para medir a atividade da redutase mitocondrial em células vivas, o que pode ser traduzido como uma medida da atividade metabólica celular (LU et al., 2012). Este ensaio tem sido amplamente utilizado para descrever alterações no perfil da resposta placentária em diversos contextos (SEUDIERO et al., 1988; WANG et al., 2018).

A atividade apresentada pelos explantes placentários pré-eclâmpticos recém coletados mostrou-se significativamente menor em comparação aos saudáveis. Este achado corrobora estudos prévios, que mostraram níveis elevados de apoptose placentária, associados à expressão anormal de proteínas que participam da via da p53 em placentas de pacientes com PE (BURTON; JONES, et al., 2009; TOMAZ, et al., 2011). Um estudo recente também descreveu o papel da Mitofusina-2 (Mfn-2), uma proteína mitocondrial relacionada à proliferação celular e metabolismo, em placentas de mulheres com PE, relacionando sua expressão diminuída com baixos níveis metabólicos e de viabilidade (YU et al., 2016). Falhas na regulação do sistema complemento no tecido fetal ou a excessiva ativação deste sistema no organismo materno parecem também estar relacionadas à integridade das vilosidades coriônicas pré-eclâmpticas (LOKKI et al., 2014).

Por outro lado, quando vilosidades de gestantes com pré-eclâmpsia foram submetidas a uma ambiente saudável, a atividade metabólica das vilosidades PE atingiu níveis semelhantes aos das placentas saudáveis. Este achado, sugere que a placenta pré-eclâmptica retém a capacidade de modular sua fisiologia em função do ambiente, resgatando um aspecto mais semelhante ao normal em termos de viabilidade metabólica. Esta plasticidade metabólica dos vilos coriônicos também foi observada quando vilosidades de gestantes saudáveis foram tratadas com soro PE, o que levou a uma relevante diminuição de suas atividades metabólicas. Claramente, observamos uma

modulação das atividade funcional das células coriônicas em função do ambiente.

Muitos fatores intencionalmente inseridos no ambiente de cultivo podem levar a injurias celulares, com redução da atividade metabólica e até mesmo indução de morte celular. Particularmente essa diminuição da atividade metabólica dos explantes placentários, indica fatores PE-específicos atuando sobre essas células. No contexto deste estudo, uma possibilidade é a presença de citocinas inflamatórias em abundância no soro de gestantes com PE. Possíveis mecanismos pelas quais citocinas podem afetar a sobrevivência do trofoblasto incluem a regulação da expressão e/ou função de componentes da cascata apoptótica. Já foi mostrado, que a presença de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , podem atuar desta forma aumentando a atividade de caspase-3 (GARCIA-LIORET et al., 1996; ASCHKENAZI et al., 2002).

Por outro lado, evidências mostram que a apoptose induzida, por exemplo por citocinas inflamatórias, pode ser contida por um balanço positivo de fatores de sobrevivência, como o EGF, o FGF, o IGF-1 e o PDGF-AA (GARCIA-LIOR et al., 1996; SMITH et al., 2002). Desta forma, é possível que os resultados observados com as placentas PE sejam uma expressão final deste balanço; aonde o soro da paciente saudável pode estar ativando ou carreando fatores de sobrevivência capazes de neutralizar a indução de injuria do quadro de PE.

Outro parâmetro também relacionado à integridade placentária é a proporção de nós sinciciais. Com o avanço da gestação, a superfície de contato entre o sangue materno e as vilosidades coriônicas aumenta através da incorporação constante de células do citotrofoblasto ao sinciciotrofoblasto. O destino dos núcleos do sinciciotrofoblasto na medida em que diminuem significativamente sua atividade sintética é de se organizarem em multi-agregados, os nós sinciciais, que são estruídos a partir da superfície desta camada para o espaço intervilloso e, conseqüentemente, para a circulação materna (BENIRSCHKE et al., 2006). Ainda guardando alguma atividade metabólica, estas estruturas assumem diferentes funções, como a indução de mecanismos de tolerância periféricos. Aumento destes agregados nucleares é

observado em condições de insulto à camada trofoblástica, seja mecânico, químico ou patogênico (RAJAKUMAR et al., 2012; BENIRSCHKE et al., 2016).

Neste estudo, as placentas de gestantes PE apresentaram maior número de nós sinciciais em comparação às placentas saudáveis, assim como as placentas de mulheres saudáveis tratadas com soro PE. Este achado corrobora estudos anteriores em que foi mostrado aumento de nós sinciciais na PE, atribuído à condição de hipóxia característica desta patologia (HEAZELL et al., 2007; BURTON; JONES, 2009). O aumento dos nós sinciciais no sistema *in vitro* com o soro PE, reforça o papel deste soro como fator de injúria às células trofoblásticas.

A exposição de placentas PE ao soro de gestantes saudáveis, no entanto, não alterou a densidade dos nós sinciciais. Este resultado era esperado, uma vez que a presença de um ambiente saudável, por um período de 24 horas apenas, pode não ter sido suficiente para o desprendimento dos nós previamente formados pela condição PE. Em outras palavras, é possível, que em tempos mais longos de cultivo, os núcleos associados à condição prévia de PE possam ser descartados e um panorama diferente seja observado.

### **7.3 Alterações na expressão de fatores angiogênicos sFlt-1 e PlGF em função do microambiente**

Com base no pressuposto de que a sinalização do ambiente é um importante regulador dos comportamentos celulares, este estudo analisou o efeito do soro de gestantes PE sobre a expressão de sFlt-1 e PlGF em vilosidades coriônicas de gestantes saudáveis.

A expressão protéica e gênica de sFlt-1 em vilosidades saudáveis cultivadas com soro PE aumentou significativamente em relação ao controle cultivado com soro saudável, ao mesmo tempo em que os níveis proteicos de PlGF diminuíram. Esses dados corroboram estudos em linhagens de células trofoblásticas e explantes placentários, em que também se observou alteração similar (MAHAMEED, et al., 2015; GANAPATHY, et al., 2006).

Os efeitos do soro PE sobre os vilos coriônicos de placentas de gestantes saudáveis indicam, sobretudo, uma capacidade de ativação e subsequente expressão de genes, detectados por sua transcrição em RNA mensageiros específicos e ainda nas mudanças nos níveis protéicos destes produtos. Este contínuo estímulo na interface materno-fetal nas pacientes pré-eclâmplicas, pode fazer parte do agravamento desta doença, na medida em que mantém o estímulo ao aumento da expressão de sFlt-1 e diminuição de PIGF.

Um efeito sobre a atividade gênica e protéica dos vilos de gestações pré-eclâmplicas cultivadas na presença de soro saudável, o que poderia significar uma possibilidade de amenizar a condição pré-eclâmptica, entretanto, não foi observado. A presença do soro saudável resultou em maiores níveis expressão gênica e proteica de PIGF, mas não reduziu os de sFlt-1, que inclusive mostrou níveis ainda mais altos de expressão em relação ao controle. Esse padrão de resposta com aumento de sFlt-1 acompanhando a bio-disponibilidade de PIGF, não resultou, portanto na aproximação de um perfil semelhante ao da condição saudável. Uma possível explicação pode ser o curto tempo de cultivo, talvez não suficiente para desprogramação da expressão de sFlt1 nessas células.

Por outro lado, conforme mostrado em estudos em modelos animais, sFlt-1 é um das principais peças no desenvolvimento da hipertensão associada a disfunção endotelial (BRIDGES et al., 2009) e talvez na PE, as vias de sua regulação sejam independentes das condições ambientais.

A PE é um distúrbio vascular sistêmico, que frequentemente afeta o fígado materno, com enzimas hepáticas elevadas e, em casos mais extremos, com desordem do sistema de coagulação, descolamento da placenta, ascite, sangramento intra-abdominal, edema pulmonar e insuficiência renal. Complicações cerebrovasculares, incluindo acidente vascular cerebral e hemorragia cerebral, responsáveis por mortes relacionadas à eclâmpsia. Em vista disso, é possível que a interface fetal materna exposta a essas condições por semanas de gestação tenha alterado ou até mesmo perdido irreversivelmente o padrão regulatório da resposta sFlt-1 em função do ambiente.

#### 7.4 A modulação do perfil de citocinas

Interações materno-fetais incluem o estabelecimento de um estado inflamatório sistêmico leve, intimamente ligado à ativação do endotélio vascular e leucócitos, e a respostas específicas das células decíduas e trofoblásticas. Ele é particularmente aparente no primeiro e terceiro trimestre da gravidez (WILLIAMS, et al., 2009; REDMAN; SARGENT, 2010). Alterações neste delicado equilíbrio imunológico, com desvio para um perfil inflamatório, tem sido demonstrado em mulheres PE, apoiando o papel das citocinas como mediadores críticos da disfunção vascular nessa desordem. (SAITO, et al., 2007; DANEVA, et al., 2016).

Em nosso estudo, o soro de pacientes com PE aumentou os níveis de IL-12, IL-8 e IL-1 $\beta$  em placentas saudáveis, sugerindo uma modulação imposta pelo ambiente. As citocinas pró-inflamatórias são produzidas em resposta a estímulos inflamatórios, que certamente estão presentes no soro de mulheres pré-eclâmpticas. Além disso, indicam o potencial placentário em contribuir com citocinas inflamatórias para o organismo materno, o que pode refletir um ciclo de agravamento da doença que se perpetua nesse processo de ativação mútua.

A IL-1 $\beta$  é uma componente fundamental da resposta pró-inflamatória, com múltiplas funções no sistema imune inato, atuando como orquestrador da inflamação em cenários de lesão. Seus níveis estão elevados no plasma de mulheres PE (FERGUSON et al., 2017), mas sua expressão pelos tecidos placentários é controversa (OPSJON et al., 1995; RINEHART, et al., 1999). A secreção por explantes placentários tem sido relatada em resposta à hipóxia (BENYO, et al., 2001), uma condição também observada na PE de início precoce (AMASH, et al., 2010).

Corroborando nossos achados, a produção placentária de IL-8 também foi previamente relatada em alta concentração na placenta a termo (SHIMOYA, et al., 1992). O RNAm e a proteína IL-8 estavam localizados no citotrofoblasto, no sinciciotrofoblasto e nas células Hofbauer da placenta (SAITO et al., 1994). Embora a IL-8 seja primariamente um potente quimioatrativo de neutrófilos (HARADA et al., 1994), também está envolvida na indução de angiogênese

(WU et al., 2018) e, recentemente, parece desempenhar papéis importantes na migração e invasão de células trofoblásticas (JOVANOVIĆ, et al., 2010). Nos ensaios que conduzimos o aumento placentário de IL-8 em placentas estimuladas com soro de PE pode ser uma resposta à produção exacerbada da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ , um fator chave na indução de outras citocinas pró-inflamatórias. Além disso, uma resposta placentária aos fatores de PE para aumentar a angiogênese via IL-8 também é uma possibilidade. Juntos, esses dados confirmam a existência de uma resposta pró-inflamatória placentária ao PE sérico e reforçam nossa hipótese de que o ambiente PE pode contribuir para a disfunção placentária materna.

Durante a gestação, a presença de IL-10 parece ser uma condição essencial para integrar a interface materno-fetal e o organismo materno. Curiosamente, detectamos aumento da produção de IL-10, um forte supressor de citocinas pró-inflamatórias, em uma resposta conjunta com as interleucinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-8. Neste contexto, é possível que a produção de IL-10 placentário tenha sido um mecanismo compensatório para restaurar a homeostase do meio ambiente.

Além disso, questionamos qual pode ser o comportamento da placenta do PE, adaptado a um estado inflamatório, em um ambiente saudável. Soro de gestantes saudáveis induziu redução significativa de IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  em placentas de PE e elevou os níveis de IL-10 e IL-1 $\beta$ . Essas mudanças enfatizam a possível interferência do ambiente quando estímulos específicos não são perpetuados e a plasticidade das células da placenta para acomodar-se rapidamente a uma nova condição. A redução de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 e aumento de IL-10 parece se encaixar nesse conceito, contribuindo para atenuar as características inflamatórias da placenta de PE. No entanto, o soro de gestantes saudáveis não foi eficiente na redução da IL-1 $\beta$ . É possível que a IL-1 $\beta$ , sendo um fator chave inflamatório, tenha mecanismos regulatórios diferentes das citocinas inflamatórias remanescentes analisadas.

Evidências mostram que a molécula NALP3 da via do inflamassoma está positivamente regulada em placentas de mulheres com PE (WEEL, et al., 2017), o que pode estar associado à produção de IL-1 $\beta$  em nosso contexto experimental. O inflamassoma é constituído por um complexo de proteínas que

medeiam a resposta imune inata via caspase-1 promovendo, entre outros fatores, a produção de IL-1 $\beta$  (GUO et al, 2015). Em pacientes pré-eclâmpticas, a excessiva produção de citocinas inflamatórias (RAGHUPATHY, 2013) associada à produção insuficiente de IL-10 pela placenta (MAKRIS, et al., 2016) e, periférica por monócitos (PERAÇOLI, et al., 2013), colabora para a instalação de um quadro inflamatório persistente que, combinada à produção de ácido úrico elevada, pode elevar também os níveis de IL-1 $\beta$ .

Diante deste quadro, é possível que o tempo de exposição a estes fatores, possa ter ocasionado um *imprinting* genômico, tornando estas características irreversíveis. Variações epigenéticas intrauterina têm sido associadas a resultados adversos da gravidez, e não surpreendentemente, dadas as suas funções multifacetadas e importante papel na regulação do sucesso gestacional, a placenta apresenta características epigenéticas únicas. A variação epigenética placentária está emergindo como uma possível mediadora de influência ambiental no funcionamento placentário e reguladora chave do prognóstico gestacional (JANUAR, et al., 2015; CARNEY, 2017).

A partir desses dados, é evidente que os explantes de vilos placentários de um paciente saudável são mais suscetíveis a responder às condições ambientais do que os explantes obtidos de gestantes pré-eclâmpticas. Enquanto a placenta saudável com soro PE mimetiza padrões de fatores inflamatórios e angiogênicos observados na PE, a placenta pré-eclâmptica não reverteu a produção de sFlt-1 quando submetida a um ambiente saudável. Esses dados enfatizam a plasticidade da interface materno-fetal e a possibilidade de um circuito de auto-alimentação resultante de proteínas circulantes levando a mudanças na secreção placentária e agravando a condição pré-eclâmptica.

## **7.5 Considerações finais**

O sucesso da gestação depende de uma série de fatores que, juntos, irão compor a rede de interação equilibrada entre mãe e feto. Qualquer desequilíbrio nesta regulação poderá comprometer a gestação. Tentativas de explicar a etiologia da PE resultaram em uma infinidade de postulados.

Atualmente, as condições de maior relevância incluem estudos relacionados à placentação defeituosa, predisposição genética, mal adaptação imunológica, baixa tolerância a alterações inflamatórias, desequilíbrio angiogênico e desequilíbrio nutricional. Porém, sua natureza multifatorial permite sua observação através de diferentes contextos. Sendo assim, neste trabalho optamos por uma nova perspectiva de estudos sobre a fisiologia da PE voltando-se para as condições maternas na modulação da resposta local, em um cenário que por décadas foi direcionado principalmente ao comprometimento funcional do trofoblasto.

Nosso estudo apresenta algumas limitações incluindo a pequena amostragem do grupo de gestantes pré-eclâmpticas puras, uma vez que todos os casos de PE que apresentavam alguma outra co-morbidade foram descartados ao longo do período de seleção. As condições de cultivo das vilosidades coriônicas foram estabelecidas em normóxia e, sabe-se que a PE surge em um contexto onde há baixa perfusão placentária, sendo assim, não temos como descartar a possibilidade de uma resposta celular diferente em um ambiente hipóxico. Se levarmos em consideração a forma como os experimentos foram conduzidos, podemos inferir que induzimos uma alteração no microambiente original ao qual as vilosidades coriônicas estavam adaptadas e isso representa um tipo de modulação que pode levar a variações epigenéticas. Sendo assim, futuras análises nos padrões de modulação epigenética, controle por micro RNAs ou exossomas, poderiam oferecer novas perspectivas em relação à resposta placentária frente alterações no microambiente. Nossos dados são consistentes no que se diz respeito à plasticidade da placenta pré-eclâmptica, respondendo a variações do microambiente e, em termos, tentando aproximar-se do perfil de resposta de uma placenta saudável. Nossos resultados reforçam também os dados da literatura em relação às características marcantes da placenta pré-eclâmptica quanto a produção do fator anti-angiogênicos Flt-1 e IL-1 $\beta$ , levantando a correlação com as possíveis modulações epigenéticas sofridas pelas células do trofoblasto durante a gestação.

## **8. CONCLUSÕES**

Nossos resultados nos permitiram concluir que:

- i) Placentas saudáveis são mais sensíveis às variações das condições ambientais do que os explantes de placentas de mulheres com PE;
- ii) Existe uma plasticidade da interface materno-fetal com modulação da expressão de fatores de regulação angiogênica em função das alterações do meio ambiente;
- iii) A instalação de um circuito de retroalimentação dos fatores angiogênicos associados a PE por meio da expressão placentária, pode ser um agravante para a condição pré-eclâptica;
- iv) Essa é a primeira vez que é detectada uma possível ação retro dependente do sangue materno que, ao banhar a superfície trofoblástica pode desencadear uma resposta multiplicadora e patologicamente agravante para o estabelecimento da PE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. C. O. G. American College of Obstetricians and Gynecologists. Hypertension in pregnancy: Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists task force on hypertension in pregnancy. **Obstetrics and gynecology**. v.122. 1122. 2013

AGGARWAL, P. K.; CHANDEL, N.; JAIN, V. et al. The relationship between circulating endothelin-1, soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin in preeclampsia. **J Hum Hypertens**. n.26, p.236-241, 2012.

APLIN, J. D.; HAIGH, T.; JONES, C. J. et al. Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin alpha5beta1. **Biol Reprod**. v.60. p.828-38. 1999.

AMASH, A.; WEINTRAUB, A. Y.; SHEINER, E. et al. Possible therapeutic effect of magnesium sulfate in pre-eclampsia by the down-regulation of placental tumor necrosis factor-alpha secretion. **Eur Cytokine Netw**. v.21. p.58-64. 2010.

ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J Exp Med**. v.192, p.259-270, 2000.

ASCHKENAZI, S.; STRASZEWSKI, S.; VERWER, K. M.; FOELLMER, H.; RUTHERFORD, T.; MOR, G.; Differential regulation and function of the fas/fas ligand system in human trophoblast cells. **Biol Reprod**. n.66. p.1853–1861. 2002.

BARKER, D. J. Adult consequences of fetal growth restriction. **Clin Obstet Gynecol**. v.49, p.270-283, 2006.

BRAMHAM, K.; PARNELL, B.; NELSON-PIERCY, C.; SEED, P. T.; POSTON, L.; CHAPPELL, L. C. Chronic hypertension and pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. **BMJ**. v.15, p.348, g2301. Review. 2014

BARTSCH, E.; MEDCALF, K. E.; PARK, A. L.; RAY, J.G.; High Risk of Pre-eclampsia Identification Group. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. **BMJ**. v.19. n.353. i.1753. 2016.

BENYO, D. F.; SMARASON, A.; REDMAN, C. W.; et al. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**. v.86. p.2505-12. 2001.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P.; BAERGEN, R. N. **Pathology of Human Placenta**. In\_\_\_\_\_Early Development of the Human Placenta. Springer. 5ª edição. New York. p.42-48. 2006.

- BRIDGES, J. P.; GILBERT, J. S.; COLSON, D.; et al. Oxidative stress contributes to soluble fms-like tyrosine kinase-1 induced vascular dysfunction in pregnant rats. **Am J Hypertens**. v.22. n.5. p.564–568. 2009.
- BROSENS, I. A.; ROBERTSON, W. B.; DIXON, H. G. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. **Obstet Gynecol Annu**. n.1, p.177-91, 1972.
- BURTON, G. J.; JONES, C. J. Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta. **Taiwan J Obstet Gynecol** v.48. n.1. p.28–37. 2009.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. The cytotrophoblastic shell and complications of pregnancy. **Placenta**. n.60, p.134–9, 2017.
- CANIGGIA, I.; WINTER, J.; LYE, S. J. et al. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. **Placenta**. n.21, p.25-30, 2000.
- CARNEY, E. F. Epigenetics: Disturbed imprinting in pre-eclampsia. **Nat Rev Nephrol**. v.13. n.11. p.663. 2017
- CARTWRIGHT, J. E.; WILLIAMS, P. J. Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in pre-eclampsia. **J Endocrinol**. n.1, p.79-85, 2012.
- CONDE-AGUDELO, A.; VILLAR, J.; LINDHEIMER, M. World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia. **Obstet Gynecol**. v.104, n.6, p.1367-91, 2004.
- CINCOTTA, R. B.; BRENNECKE, S. P. Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. **Int J Gynaecol Obstet**. v.60. n.1. p.23-7. 1998.
- COSTA, R. A.; HOSHIDA, M. S.; ALVES, E. A.; ZUGAIB, M.; FRANCISCO, R. P. Preeclampsia and superimposed preeclampsia: The same disease? The role of angiogenic biomarkers. **Hypertens Pregnancy**. v.35. n.2. p.139-49. 2016.
- DANEVA, A. M.; HADŽI-LEGA, M.; STEFANOVIC, M. Correlation of the system of cytokines in moderate and severe preeclampsia. **Clin Exp Obstet Gynecol**; v.43. p.220-224. 2016.
- Di FEDERICO, E.; GENBACEV, O.; FISHER, S. J. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. **Am J Pathol**. v.155, n.1, p.293-301, 1999.
- DRAGAN, I.; GEORGIU, T.; PRODAN, N.; AKOLEKAR, R.; NICOLAIDES, K. H.; Screening for pre-eclampsia using sFlt-1/PIGF ratio cut-off of 38 at 30-37 weeks' gestation. **Ultrasound Obstet Gynecol**. v.49. n.1. p.73-77. 2017.

DUCKITT, K.; HARRINGTON, D. Risk factors for preeclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. **BMJ**. v.330, n.12, p.7491-565, 2005.

DULEY, L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. **Semin Perinatol**. v.33. n.3. p.130-7. 2009.

EL-SAYED, A. A. F. Preeclampsia: A review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements. **Taiwan J Obstet Gynecol**. v.56. n.5. p.593-598. 2017.

ESCOBAR, V. M.F.; MONTES, D.; PÉREZ, A.; LOAIZA-OSORIO, S.; JOSÉ NIETO CALVACHE, A. Hepatic rupture associated with preeclampsia, report of three cases and literature review. **J Matern Fetal Neonatal Med**. Mar v.27. p.1-7. 2018.

FAN, X.; RAI, A.; KAMBHAM, N.; SUNG, J. F.; SINGH, N.; PETITT, M.; DHAL, S.; AGRAWAL, R.; SUTTON, R. E.; DRUZIN, M. L.; GAMBHIR, S. S.; AMBATI, B. K.; CROSS, J. C.; NAYAK, N. R. Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. **J Clin Invest**. v.124. n.11. p.4941-52. 2014.

FERGUSON, K. K.; MEEKER, J. D.; McELRATH, T. F.; MUKHERJEE, B.; CANTONWINE, D. E.; Repeated measures of inflammation and oxidative stress biomarkers in preeclamptic and normotensive pregnancies. **Am J Obstet Gynecol**. v.216, n.5, p.527. 2017

FOUND, S. A.; CONLEY, Y. P.; LYONS-WEILER, J. F.; JEYABALAN, A.; HOGGE, W. A.; CONRAD, K. P. Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. **Placenta**. v.30, n.1 p.15-24, 2009.

GANAPATHY, R.; AYLING, L. J.; WHITLEY, G. S.; et al. Effect of first-trimester serum from pregnant women with high-resistance uterine artery Doppler resistance on extravillous trophoblast invasion. **Hum Reprod**. v.21.p.1295-8. 2006

GARCIA-LIORET, M.; YUI, J.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J. Epidermal growth factor inhibits cytokine-induced apoptosis of primary human trophoblasts. **J Cell Physiol**, v.167. p.324–332. 1996.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; COOPER, C. et al. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. **N Engl J Med** n.359, p.61-73, 2008.

GODBOLE, G.; SUMAN, P.; GUPTA, S. K. et al. Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. **Fertil Steril** n.95, p. 1278-1283, 2011.

GONZALEZ, M.; NEUFELD, J.; REIMANN, K. et al. Expansion of human trophoblastic spheroids is promoted by decidualized endometrial stromal cells and enhanced by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and interleukin-1  $\beta$ . **Mol Hum Reprod.** n.17, p.421-433, 2011.

GOULOPOULOU, S.; DAVIDGE, S. T.; Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. **Trends Mol Med.** n.21, p.88-97, 2015.

GRILL, S.; RUSTERHOLZ, C.; ZANETTI-DÄLLENBACH, R.; TERCANLI, S.; HOLZGREVE, W.; HAHN, S.; LAPAIRE, O. Potential markers of preeclampsia- a review. **Reprod Biol Endocrinol.** n.14 p.7-70, 2009.

GU, Y.; LEWIS, D. F.; WANG, Y. Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. **J Clin Endocrinol Metab.** n.93, p.260-266, 2008.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat. Med.** v.21. p.677–687. 2015.

HARADA A, SEKIDO N, AKAHOSHI T, et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **J Leuk Biol.** v.56. p.559–64. 1994.

HE, N.; VAN IPEREN, L.; DE JONG, D.; SZUHAI, K.; HELMERHORST, F. M.; VAN DER WESTERLAKEN, L. A.; et al. Human extravillous trophoblasts penetrate decidual veins and lymphatics before remodeling spiral arteries during early pregnancy. **PLoS ONE.** v.12, n.1, 2017.

HEAZELL, A.; MOLL, S.; JONES, C.; BAKER, P.; CROCKER, I. Formation of syncytial knots is increased by hyperoxia, hypoxia and reactive oxygen species. **Placenta.** v.28. S33–S40. 2007.

HERRAIZ, I.; LLURBA, E.; VERLOHREN, S.; GALINDO, A. Update on the Diagnosis and Prognosis of Preeclampsia with the Aid of the sFlt-1/ PIGF Ratio in Singleton Pregnancies. Spanish Group for the Study of Angiogenic Markers in Preeclampsia. **Fetal Diagn Ther.** v.43. n.2. p.81-89. 2018.

HUNKAPILLER, N. M.; GASPEROWICZ, M.; KAPIDZIC, M.; PLAKS, V.; MALTEPE, E.; KITAJEWSKI, J.; CROSS, J. C.; FISHER, S. J. A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia. **Development.** v.138, n.14, p.2987-98, 2011.

HUPPERTZ, B. Maternal-fetal interactions, predictive markers for preeclampsia, and programming. **J Reprod Immunol.** v.108, p.26-32, 2015.

HUPPERTZ, B. Biology of preeclampsia: Combined actions of angiogenic factors, their receptors and placental proteins. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** 2018.

IJOMONE, O. K.; SHALLIE, P.; NAICKER, T. Changes in the structure and function of the brain years after Pre-eclampsia. **Ageing Res Rev.** v.47. p.49-54. 2018.

ISLAMI, D.; BISCHOF, P.; CHARDONNENS, D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. **Mol Hum Reprod.** n.9, p.395-398, 2003.

JANUAR, V.; DESOYE, G.; NOVAKOVIC, B.; CVITIC, S.; SAFFERY, R.; Epigenetic regulation of human placental function and pregnancy outcome: considerations for causal inference. **Am J Obstet Gynecol.** v.213. n.4 (Suppl):S182-96. 2015.

JOVANOVIĆ, M.; STEFANOSKA, I.; RADOJČIĆ, L. et al. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. **Reproduction.** v.139. p.789-98. 2010.

KAITU'U-LINO, T. J.; PALMER, K. R.; WHITEHEAD, C. L.; WILLIAMS, E.; LAPPAS, M.; TONG, S. MMP-14 is expressed in preeclamptic placentas and mediates release of soluble endoglin, **Am. J. Pathol.** n.180, p.888–894, 2012.

KAITU'U-LINO, T. J.; TUOHEY, L.; YE, L.; PALMER, K.; SKUBISZ, M.; TONG, S. MT-MMPs in pre-eclamptic placenta: relationship to soluble endoglin production. **Placenta.** v.34, n.2, p.168-73, 2013.

KENNY, L. C.; BROADHURST, D. I.; DUNN, W.; BROWN, M.; NORTH, R. A.; MCCOWAN, L.; ROBERTS, C.; COOPER, G. J.; KELL, D. B.; BAKER, P. N.; and Screening for Pregnancy Endpoints Consortium. Robust early pregnancy prediction of later preeclampsia using metabolomic biomarkers. **Hypertension.** v.56, n.4, p.741-9, 2010.

KENNY, L. C.; BLACK, M. A.; POSTON, L.; TAYLOR, R.; MYERS, J. E.; BAKER, P. N.; MCCOWAN, L. M.; SIMPSON, N. A.; DEKKER, G. A.; ROBERTS, C. T.; RODEMS, K.; NOLAND, B.; RAYMUNDO, M.; WALKER, J. J.; NORTH, R. A. Early pregnancy prediction of preeclampsia in nulliparous women, combining clinical risk and biomarkers: the Screening for Pregnancy Endpoints (SCOPE) international cohort study. **Hypertension.** v.64, n.3, p.644-52, 2014.

KNÖFLER, M.; POLLHEIMER, J. IFPA Award in Placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion. **Placenta.** v.33, pS55-62, 2012, Supplement.

KUKLINA, E. V.; AYALA, C.; CALLAGHAN, W. M. Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States. **Obstet Gynecol.** v.113. n.6. p.1299-306. 2009.

LEVINE, R. J.; MAYNARD, S. E.; QIAN, C. et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. **N Engl J Med.** n.7, p.672-83, 2004.

LONGTINE, M. S.; NELSON, D. M.; Placental dysfunction and fetal programming: the importance of placental size, shape, histopathology, and molecular composition. **Semin Reprod Med.** v.29, n.3, p.187-96, 2011.

LOKKI, A. I.; HEIKKINEN-ELORANTA, J.; JARVA, H.; SAISTO, T.; LOKKI, M. L.; LAIVUORI, H.; MERI, S. Complement activation and regulation in preeclamptic placenta. **Front Immunol.** v.9. n.5. p.312. 2014.

LÜ, L.; ZHANG, L.; WAI, M. S. M.; YEW, D. T. W.; XU, J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. **Toxicol in Vitro.** v.26. p.636–44. 2012.

LYALL, F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy-a review. **Placenta.** v.26, p.S31-6, 2005. Review Supplement A.

MAHAMEED, S.; GOLDMAN, S.; GABARIN, D. et al. The effect of serum from women with preeclampsia on JAR (trophoblast-like) cell line. **J Soc Gynecol Investig;** v.12. p.45-50. 2005.

MAGEE, L. A.; PELS, A.; HELEWA, M.; REY, E.; VON DADELSZEN, P. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. Canadian Hypertensive Disorders of Pregnancy (HDP) Working Group. **Pregnancy Hypertens.** v.4, n.2, p.105-45, 2014. Review.

MAKRIS, A.; XU, B.; YU, B.; THORNTON, C.; HENNESSY, A. Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to an IL10 promoter polymorphism. **Placenta.** v.27. p. 445–451. 2006.

MARTIN, D.; CONRAD, K. P. Expression of endothelial nitric oxide synthase by extravillous trophoblast cells in the human placenta. **Placenta.** v.21, p.23-31, 2000.

MATJILA, M.; MILLAR, R.; VAN DER SPUY, Z.; KATZ, A. The differential expression of Kiss1, MMP9 and angiogenic regulators across the feto-maternal interface of healthy human pregnancies: implications for trophoblast invasion and vessel development. **PLoS One.** v.16, 8(5):e63574. 2013.

MAYNARD, S. E.; MIN, J. Y.; MERCHAN, J.; LIM, K, H.; LI, J.; MONDAL, S.; LIBERMANN, T. A.; MORGAN, J, P.; SELLKE, F. W.; STILLMAN, I. E.; EPSTEIN, F. H.; SUKHATME, V. P.; KARUMANCHI, A. S. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **J Clin Invest.** v.111, n.5, p.649-58, 2003.

McCARTHY, C.; COTTER, F. E.; McELWAINE, S. et al. Altered gene expression patterns in intrauterine growth restriction: potential role of hypoxia. **Am J Obstet Gynecol.** v.196, n.70, e1-6, 2007.

MORI, T.; WATANABE, K.; IWASAKI, A.; KIMURA, C.; MATSUSHITA H.; SHINOHARA, K.; WAKATSUKI, A. Differences in vascular reactivity between pregnant women with chronic hypertension and preeclampsia. **Hypertens Res.** v.37. n.2. p145-50. 2014.

MYATT, L. Placental adaptive responses and fetal programming. **J Physiol.** v.572, n.1, (PT 1), p.25-30, 2006. REVIEW.

MYATT, L.; CLIFTON, R. G.; ROBERTS, J. M.; SPONG, C. Y.; WAPNER, R. J.; THORP, J. M. Jr.; MERCER, B. M.; PEACEMAN, A. M.; RAMIN, S. M.; CARPENTER, M. W.; SCISCIONE, A.; TOLOSA, J. E.; SAADE, G.; SOROKIN, Y.; ANDERSON, G. D.; and Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Can changes in angiogenic biomarkers between the first and second trimesters of pregnancy predict development of pre-eclampsia in a low-risk nulliparous patient population? **BJOG.** v.120, n.10, p.1183-91, 2013.

MYATT, L.; ROBERTS, J. M. Preeclampsia: Syndrome or Disease? **Curr Hypertens Rep.** n.17. v.83. 2015

NORIS, M.; PERICO, N.; REMUZZI, G. Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. **Nat Clin PractNephrol.** n.1, p.98-114, 2005.

OPSON, S. L.; AUSTGULEN, R.; WAAGE, A. Interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor at delivery in preeclamptic disorders. **Acta Obstet Gynecol Scand.** v.74. p.19-26. 1995.

PALMER, K. R.; TONG, S.; KAITU'U-LINO, T. J. Placental-specific sFLT-1: role in pre-eclamptic pathophysiology and its translational possibilities for clinical prediction and diagnosis. **Mol Hum Reprod.** v.10, n.2, p.69-78, 2017.

PERAÇOLI, J. C.; BANNWART-CASTRO, C. F.; ROMAO, M.; WEEL, I. C.; RIBEIRO, V. R.; BORGES, V. T.; et al., High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early-from late-onset preeclampsia. **J Reprod. Immunol.** v.100. p.129–134. 2013.

PRICK, B. W.; BIJLENGA, D.; JANSEN, A. J.; BOERS, K. E.; SCHERJON, S. A.; KOOPMANS, C. M.; VAN PAMPUS, M. G.; ESSINK-BOT, M. L.; VAN RHENEN, D. J.; MOL, B. W.; DUVEKOT, J. J. Determinants of health-related quality of life in the postpartum period after obstetric complications. **Eur. J. Obstet Gynecol Reprod Biol.** v.185, p.88-95, 2015.

RAJAKUMAR, A.; CERDEIRA, A. S.; RANA, S.; ZSENGELLER, Z.; EDMUNDS, L.; JEYABALAN, A.; HUBEL, C. A.; STILLMAN, I. E.; PARIKH, S. M.; KARUMANCHI, S. A. Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. **Hypertension**. v.59. n.2. p.256-64. 2012.

RANA. S.; LEMOINE, E.; GRANGER, J.; KARUMANCHI S. A. Preeclampsia. *Circ Res*. v.124. n.7. p.1094-1112. 2019.

RAY, J. G.; VERMEULEN, M. J.; SCHULL, M. J. et al. Cardiovascular health after maternal placental syndromes (CHAMPS): population-based retrospective cohort study. **Lancet**. v.366, p.1797-1803, 2005.

RAGHUPATHY, R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. **Med. Princ. Pract.** v.22. p.8–19. 2013.

REDMAN, C. W. Current topic: preeclampsia and the placenta. **Placenta**. v.12, n.4, p.301-8, 1991.

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

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L.; STAFF, A. C. IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia - two placental causes of preeclampsia? **Placenta**. v.35,S20-5, 2014. Supplement.

REISTER, F.; FRANK, H. G.; KINGDOM, J. C. et al. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. **Lab Invest**. v.81, p.1143-1152, 2001.

RINEHART, B. K.; TERRONE, D. A.; LAGOO-DEENADAYALAN, S.; et al. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**. v.181. p.915-920. 1999.

ROBILLARD, P. Y.; HULSEY, T. C.; ALEXANDER, G. R.; KEENAN, A.; DE CAUNES, F.; PAPIERNIK, E. Paternity patterns and risk of preeclampsia in the last pregnancy in multiparae. **J Reprod Immunol**. v.24, n.1, p.1-12, 1993.

ROBERTS, D. J.; POST, M. D. The placenta in preeclampsia and intrauterine growth restriction. **J Clin Pathol**. v.61, p.1254-1260, 2008.

SABRIÀ, E.; LEQUERICA-FERNÁNDEZ, P.; GANUZA, P. L.; ÁNGELES, E. E.; ESCUDERO, A. I.; MARTÍNEZ-MORILLO, E.; ALVÁREZ, F. V. Use of the sFlt-1/PIGF ratio to rule out preeclampsia requiring delivery in women with suspected disease. Is the evidence reproducible? **Clin Chem Lab Med**. v.56. n.2. p.303-311. 2018.

SAFTLAS, A. F.; RUBENSTEIN, L.; PRATER, K.; HARLAND, K. K.; FIELD, E.; TRICHE, E. W. Cumulative exposure to paternal seminal fluid prior to conception and subsequent risk of preeclampsia. **J Reprod Immunol.** v.13, p.S0165-0378, 2013. Supplement.

SALEH, L.; VERGOUWE, Y.; VAN DEN MEIRACKER, A. H.; VERDONK, K.; RUSSCHER, H.; BREMER, H. A.; VERSENDAAL, H. J.; STEEGERS, E. A. P.; DANSER, A. H. J.; VISSER, W. Angiogenic Markers Predict Pregnancy Complications and Prolongation in Preeclampsia: Continuous Versus Cutoff Values. **Hypertension.** v.70. n.5. p.1025-1033. 2017.

SAITO, S.; KASAHARA, T.; SAKAKURA, S. et al. Detection and localization of interleukin-8 mRNA and protein in human placenta and decidual tissues. **J Reprod Immunol.** v.27. p.161–72. 1994.

SAITO, S.; SHIOZAKI, A.; NAKASHIMA, A.; et al. The role of the immune system in preeclampsia. **Mol Aspects Med.** v.28. p.192–209. 2007.

SCUDIERO, D. A.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T. H. et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Res.** v.8. n.48. p4827–33. 1988.

SHARKEYA. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; BOOCOOCK, C. A.; BROWN, K. D.; SMITH, S. K. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. **J Reprod Fertil.** v.99, n.2, p.609-15, 1993.

SHIMOYA, K.; MATSUZAKI, N.; TANIGUCHI, T.; et al. Human placenta constitutively produces interleukin-8 during pregnancy and enhances its production in intrauterine infection. **Biol Reprod.** v.47. p.220–6. 1992.

SMITH, S.; FRANCIS, R.; GUILBERT, L.; BAKER, P. N. Growth factor rescue of cytokine mediated trophoblast apoptosis. **Placenta.** v.23. n.4. p.322-30. 2002.

SOLEYMANLOU, N.; JURISICA, I.; NEVO, O.; IETTA, F.; ZHANG, X.; ZAMUDIO, S.; POST, M.; CANIGGIA, I. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab.** v.90, n.7, p.4299-308, 2005.

SOUZA, J. P.; GÜLMEZOGLU, A. M.; VOGEL, J.; et al. Moving beyond essential interventions for reduction of maternal mortality (the WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health): a cross-sectional study. **Lancet.** v.381, n.18, p.1747-55, 2013.

STEEGERS E. A.; VON DADELSZEN, P.; DUVEKOT, J. J. et al. Preeclampsia. **Lancet** v.376, p.631-644, 2010.

THORNTON, J. G.; HORNBUCKLE, J.; VAIL, A. et al. Infant wellbeing at 2 years of age in the Growth Restriction Intervention Trial (GRIT): multicentered randomized controlled trial. **Lancet**. v.364, p.513-520, 2004.

TOMAS, S. Z.; PRUSAC, I. K.; ROJE, D.; TADIN, I. Trophoblast apoptosis in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. **Gynecol Obstet Invest**. v.71. n.4. p.250-5. 2011.

VENKATESHA, S.; TOPORSIAN, M.; LAM, C.; HANAI, J.; MAMMOTO, T.; KIM, Y. M.; BDOLAH, Y.; LIM, K. H.; YUAN, H. T.; LIBERMANN, T. A.; STILLMAN, I. E.; ROBERTS, D.; D'AMORE, P. A.; EPSTEIN, F. H.; SELLKE, F. W.; ROMERO, R.; SUKHATME, V. P.; LETARTE, M.; KARUMANCHI, S. A.; Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia, **Nat. Med.** n.12, p.642–649, 2006.

VIANNA, P.; MONDADORI, A. G.; BAUER, M. E.; DORNFELD, D.; CHIES, J. A. HLA-G and CD8+ regulatory T cells in the inflammatory environment of pre-eclampsia. **Reproduction**. v.152. n.6. p.741-751. 2016.

YU, J.; GUO, X.; CHEN, R.; FENG, L. Downregulation of Mitofusin 2 in Placenta Is Related to Preeclampsia. **Biomed Res Int**. 6323086. 2016.

WANG, K.; LU, C.; LIU, Y.; TAO, Y. In vitro effects of sEng and TGF- $\beta$  on human umbilical vein endothelial cells and trophoblasts. **J Obstet Gynaecol Res**. v.44. n.6. p.1023-1030. 2018.

WILLIAMS, P. J.; SEARLE, R. F.; ROBSON, S. C.; et al. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. **J Reprod Immunol**. v.82. p.24-31. 2009.

WEISSGERBER, T. L.; MUDD, L. M. Preeclampsia and diabetes. **Curr Diab Rep**. v.15. n.3. p.9. 2015.

WEISSGERBER, T. L.; MILIC, N. M.; MILIN-LAZOVIC, J. S.; GAROVIC, V. D.; Impaired Flow-Mediated Dilation Before, During, and After Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Hypertension** .v.67, n.2, p. 415-23. 2016.

WEN, Q.; LIU, L. Y.; YANG, T. et al. Peptidomic Identification of Serum Peptides Diagnosing Preeclampsia. **PLoS One**. v.19, n.6, e65571, 2013.

WEEL, C. I.; ROMÃO-VEIGA, M.; MATIAS, M. L.; FIORATTI, E. G.; PERAÇOLI, J. C.; BORGES, V. T.; ARAUJO, J. P. J. R.; PERAÇOLI, M. T. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. **J Reprod Immunol**. v.123. p.40-47. 2017.

WHO. *World Health Report: Making Every Mother and Child Count*. Geneva: **World Health Organization**. 2005.

WU, H. X.; CHENG, X.; JING, X. Q.; JI, X. P.; et al. LIFR promotes tumor angiogenesis by up-regulating IL-8 levels in colorectal cancer. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** 1864(9 Pt B). p.2769-2784. 2018.

ZEISLER, H.; LLURBA, E.; CHANTRAINE, F. J.; VATISH, M.; STAFF, A. C.; SENNSTRÖM, M.; OLOVSSON, M.; BRENNECKE, S. P.; STEPAN, H.; ALLEGRANZA, D.; SCHOEDL, M.; GRILL, S.; HUND, M.; VERLOHREN, S. Soluble fms-like tyrosine kinase-1 to placental growth factor ratio: ruling out pre-eclampsia for up to 4 weeks and value of retesting. **Ultrasound Obstet Gynecol.** v.53. n.3. p.367-375. 2019.

ZHANG, X. H.; ZHANG, H. Y.; LU, S. JIANG, L. L.; WU, J.; YANG, Y. L.; ZHANG, S. A.; MMP-14 aggravates onset of severe preeclampsia by mediating soluble endoglin release. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v.5, n.22, p.1209-1215, 2018.

ZHONG, Y.; TUULI, M.; ODIBO, A. O. First-trimester assessment of placenta function and the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Prenat Diagn.** n.30, p.293-308, 2010.

ZHOU, Y.; DAMSKY, C. H.; FISHER, S. J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? **J Clin Invest** n.1, p.2152-2164, 1997.

ZHOU, Y.; GENBACEV, O.; DAMSKY, C. H. et al. Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion: implications for endovascular invasion in normal pregnancy and in pre-eclampsia. **J Reprod Immunol** n.39, p.197-213, 1998.

ZHOU, Y.; MCMASTER, M.; WOO, K.; JANATPOUR, M.; PERRY, J.; KARPANEN, T.; ALITALO, K.; DAMSKY, C.; FISHER, S. J. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. **Am J Pathol.** v.160, n.4, p.1405-23, 2002.

ZHU, X. M.; HAN, T.; SARGENT, I. L. et al. Conditioned medium from human decidual stromal cells has a concentration-dependent effect on trophoblast cell invasion. **Placenta.** v.30, p.74-78, 2009.

## Anexo 1 - Reagentes e suas procedências

**Abcam Inc.** (Cambridge, MA, USA): anticorpo monoclonal de coelho anti-sFlt-1 (Clone Y103, AB32152), anticorpo policlonal de coelho anti-PlGF (AB9542). **Ambion (Life Technologies, EUA):** Kit RNA Pure Link. **Applied Biosystems (Foster City, CA):** Kit de Transcrição Reversa de cDNA *High Capacity*, Power UP SYBR Green PCR Master Mix™. **Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia);** azul de bromofenol, tris-hidroximetil-aminometano, tween-20, membranas de nitrocelulose. **BD Biosciences, San Jose, CA:** *BD Cytometric Bead Array* (CBA), MITOS. **Bio-Rad Laboratories (CA, USA):** membrana de nitrocelulose de 0,22 micras, sistema de quimioluminescência Clarity Western ECL, padrão de peso molecular para proteínas Kaleidoscope, acrilamida. **Merck (Darmstadt, Alemanha):** Histosec®, metanol, hematoxilina de Mayer, eosina. **Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA):** piruvato de sódio, lactato de cálcio, inibidores de protease e fosfatase, silane, DMSO, tampão fosfato salina (PBS), solução salina balanceada de Hanks, meio de cultivo DMEM-F12, anticorpo primário monoclonal produzido em coelho anti- $\beta$ -actina, albumina de soro bovino (BSA), Triton X-100, persulfato de amônio, fenilmetanosulfonilfluorido (PMSF), ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_4\text{VO}_3$ ), ácido deoxicolato de sódio, Tris-HCl, glicina, tetrametiletilenediamina (TEMED). **Invitrogen (Carlsbad, CA, USA):** soro bovino fetal (SBF), dodecil sulfato de sódio (SDS), DNase I de amplificação. **KPL:** anticorpo secundário cabra anti-IgG de coelho conjugado com HRP. **R & D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, EUA):** Kits de ELISA Quantikine® específicos para VEGF R1 / Flt-1 e PLGF. **Thermo Fisher Scientific Inc., (Waltham, MA, USA):** MTT. **Pierce (Rockford, IL, EUA):** BCA Protein Assay Reagent. **Vitrocell-Embriolife (Campinas, SP, Brasil):** sulfato de gentamicina, anfotericina B, penicilina/estreptomicina.

**Figura suplementar 1** – Análise comparativa da produção global proteica dos fatores vasoativos produzidos após tratamento com soro materno – *Western Blotting*.

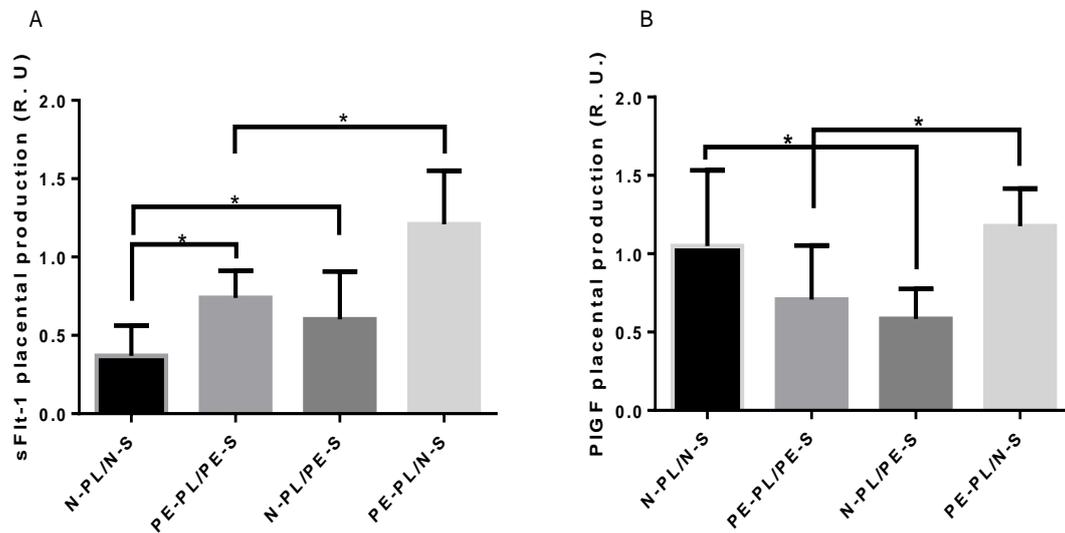


Figura suplementar 1 – Padrão global de produção proteica dos fatores vasoativos sFlt-1 (A) e PLGF (B) produzidos após tratamento com soro materno, obtida por *Western Blotting*. Explantes placentários de mulheres saudáveis (N-PL) tratadas com soro PE (PE-S) foram comparadas aos seus respectivos controles tratados com soro normal (N-S), e explantes de placentas PE (PE-PL) tratados com soro saudável (N-S) comparados com seu controle tratado com soro PE (PE-S). \* $p < 0.05$ , Teste *t* de Student.  $n = 4$ .

**Figura suplementar 2** – Análise comparativa da produção global proteica dos fatores vasoativos produzidos após tratamento com soro materno – *ELISA*

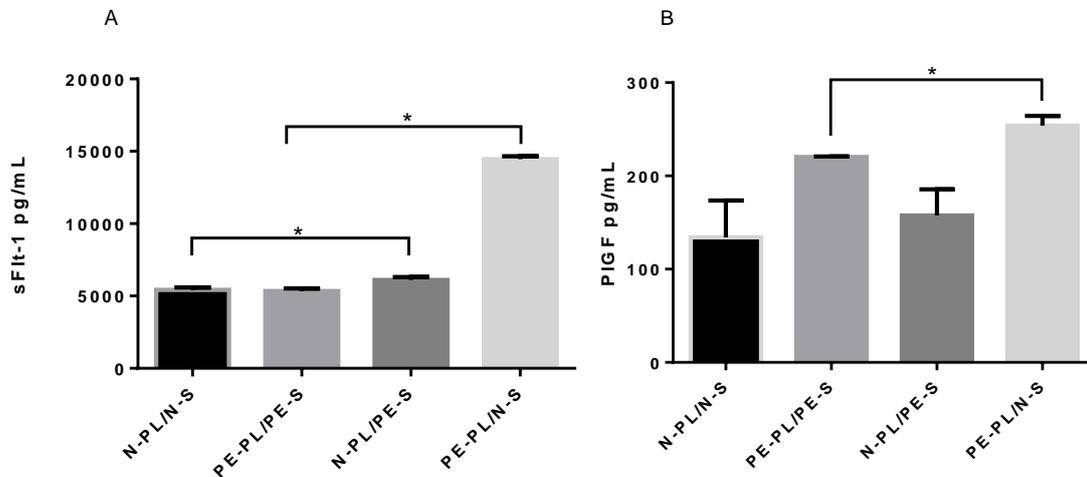


Figura suplementar 2 – Padrão global de produção proteica dos fatores vasoativos sFlt-1 (A) e PLGF (B) produzidos após tratamento com soro materno, obtida por ELISA. Explantes placentários de mulheres saudáveis (N-PL) tratadas com soro PE (PE-S) foram comparadas aos seus respectivos controles tratados com soro normal (N-S), e explantes de placentas PE (PE-PL) tratados com soro saudável (N-S) comparados com seu controle tratado com soro PE (PE-S). \* $p < 0.05$ , Teste *t* de Student.  $n = 4$ .

**Figura suplementar 3 – Análise comparativa da produção global gênica dos fatores vasoativos produzidos após tratamento com soro materno**

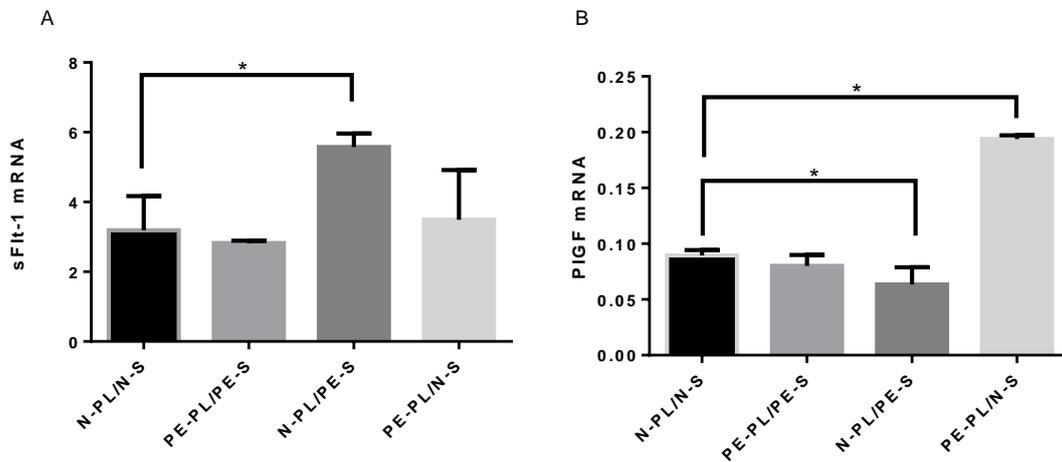


Figura suplementar 3 – Padrão global de produção gênica dos fatores vasoativos sFlt-1 (A) e PLGF (B) produzidos após tratamento com soro materno. Explantes placentários de mulheres saudáveis (N-PL) tratadas com soro PE (PE-S) foram comparadas aos seus respectivos controles tratados com soro normal (N-S), e explantes de placentas PE (PE-PL) tratados com soro saudável (N-S) comparados com seu controle tratado com soro PE (PE-S). \* $p < 0.05$ , Teste *t de Student*.  $n = 4$ .