Universidade de São Paulo
Instituto de ciências Biomédicas

Karla Ribeiro de Castro

Efeito do soro de gestantes com pré-eclâmpsia sobre a via de estresse de retículo endoplasmático em células trofoblásticas

São Paulo
2020

Karla Ribeiro de Castro

Efeito do soro de gestantes com pré-eclâmpsia sobre a via de estresse de retículo endoplasmático em células trofoblásticas

Versão Corrigida

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 e Tecidual

Orientadora: Prof. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

São Paulo

2020

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)

Ribeiro de Castro, Karla
Efeito do soro de gestantes com pré-eclâmpsia sobre a via de estresse de retículo endoplasmático em células trofoblásticas / Karla Ribeiro de Castro; orientador Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua. -- São Paulo, 2020.
133 p.

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

1. Placenta. 2. Células trofoblásticas. 3. Pré-eclâmpsia. 4. Estresse de RE. 5. UPR. I. Maris Andrade Forell Bevilacqua, Estela, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): CASTRO, Karla Ribeiro de

Titulo da Dissertação/Tese: Efeito do soro de gestantes com pré-eclâmpsia sobre a via de estresse de retículo endoplasmático em células trofoblásticas.

Orientador: Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

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

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

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

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.**

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,

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

MEDICINA
USP 100 ANOS 1912 - 2012

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

MEDICINA
USP

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - 10º andar - sala 10.036
Instituto Central - Hospital das Clínicas
CEP: 05403-000 - São Paulo - SP - Brasil
Fones: 55 11 3069.6355 / 3069.7569

São Paulo, 20 de maio de 2015.

Ilmo. Senhor
Prof. Dr. Seizo Miyadahira
Presidente do
Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia - FMUSP

REF.: ***Protocolo de Pesquisa CAPPesq Registro Online nº 774.907 – Efeito do soro de gestantes com pré-eclâmpsia sobre a atividade funcional do trofoblasto.***

Senhor Presidente,

Pelo presente vimos dar conhecimento a este Comitê de Ética em Pesquisa que o Projeto de Pesquisa em referência, sob minha coordenação e que a aluna Karen Matias do Prado desenvolve seu Doutorado, dará origem também ao Doutorado da aluna Karla Ribeiro de Castro com objetivos adicionais. Portanto, solicitamos a inclusão do subprojeto "Efeito do soro de gestante com PE sobre a via de estresse de retículo endoplasmático em células trofoblásticas". Aproveitamos para informar que a título de relatório parcial o presente projeto se encontra em fase de coleta de dados.

Solicitamos a inclusão dos seguintes pesquisadores no citado projeto: Karla Ribeiro de Castro, Mariana Matera Veras e Aline Rodrigues Lorenzon Ojea.

Sem mais de momento,
Atenciosamente.

Profa. Dra. Estela Bevilacqua
Pesquisador Responsável

Tomamos ciência. 9/6/15

Presidente do
Comitê de Ética do DOG-FMUSP

"A felicidade não está em fazer o que a gente quer, e sim querer o que a gente faz". (Jean Paul Sartre)

Dedido esta tese ao meu eterno amor Henrique, ao meu pai Sergio (in memoriam), à minha mãe Ruth, que sempre se orgulharam dos meus esforços para me tornar o que sou hoje.

À Profa. Dra Estela Bevilcqua

Minha imensa gratidão por ter me aceito como aluna, pelos ensinamentos e paciência, por ter acreditado em mim para a realização deste trabalho e principalmente por permitir que meu sonho fosse realizado.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao Santo Expedito por tudo que consegui.

Ao meu companheiro Henrique Prado Torres, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando em todas as minhas decisões e sempre esteve ao meu lado principalmente nas horas mais difíceis, sem você nada disso seria possível;

À amiga Dra. Karen Prado por toda amizade e companheirismo desde que nos conhecemos. Sempre disposta a me ajudar e apoiar mesmo nos momentos mais difíceis.

À técnica e amiga Rose, pelo auxílio na preparação das culturas que sempre me apoiou e esteve ao meu lado, principalmente quando perdi meu pai, sempre me dizendo palavras positivas de superação.

Às Dras. Aline Lorenzon, Elaine Cardoso, Carla Bandeira e Sara Zago, por todo suporte às técnicas de Western Blotting, qPCR e culturas de células.

Obrigada aos meus colegas e amigos do Trofo's Lab – Ying, Simone, Jusciele,

À mestranda Franciele Araújo, aos estagiários Rafael Almeida, Milena Mirandola, Jady Rabelo e Jefferson Sampaio e o técnico Marco Aurélio Amadeo e ao novo integrante do "Tropho's Lab" Gustavo Henrique, pela amizade e auxílio nos experimentos.

À Professora Dra. Caroline Beltrame e todos os amigos do curso de verão.

À Professora Dra. Patricia Gama e Melissa Silva, por todo apoio e suporte durante o período em que fui representação discente.

À Professora Dra. Rossana V. F. Pulcinelli e Dra. Mara Hoshida e a Dra. Eliane Alves do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) por todo suporte e colaboração.

Aos técnicos do LIM 57 (Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP) pelo auxílio nas coletas das placentas.

À enfermeira Ana Maria Souza do Hospital das Clinícas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na coleta de sangue das gestantes.

À secretária do departamento Tania, pelo suporte e auxílio.

Às gestantes que aceitaram participar deste estudo.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

CASTRO, KR. *Efeito do soro de gestantes com pré-eclâmpsia sobre a via de estresse de retículo endoplasmático em células trofoblásticas* [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

É no retículo endoplasmático que ocorre a síntese, o enovelamento e a maturação de proteínas, sendo esta uma organela extremamente sensível às variações de estímulos que possam interferir na homeostase celular. Quando há um ambiente desfavorável ou maior demanda de síntese proteica, ocorre uma falha no enovelamento de proteínas e inicia-se um acúmulo de proteínas mal-enoveladas, levando a célula ao Estresse de Retículo Endoplasmático (RE). Em resposta, ocorre a ativação da via de sinalização conhecida como resposta às proteínas mal-enoveladas (do inglês, *Unfolded Protein Response*, UPR). Se a URP falhar na restauração da homeostase celular, a própria via ativa mecanismos que levam à apoptose, evitando que a célula secrete para o ambiente extracelular moléculas não-funcionais. A UPR tem sido estudada em diversas fisiopatologias como doenças neurodegenerativas e diabetes e, na gestação, a pré-eclampsia (PE) precoce. Na PE, há um desbalanço na síntese e liberação de fatores placentários associado a uma resposta materna sistêmica que consiste em inflamação vascular generalizada. Evidências mostram uma relevância neste desbalanço dos produtos placentários na patogenese da PE. Neste estudo, avaliamos o efeito do soro de gestante PE sobre a via de estresse de RE nos explantes coriônicos de placentas a termo saudáveis, tratadas com soro das gestantes saudáveis (controle) e com PE por 24h e em células HTR-8/Svneo por 3h, 6h, 12h e 24h. A razão sFlt-1/PlGF foi maior no soro das gestantes com PE (p=0,02). Após 24h de tratamento com o soro PE, os explantes placentários apresentaram redução no metabolismo celular e viabilidade celular (p=0,007) tiveram mais mortes quando comparados com o controle (p=0,01). Houve um aumento significativo na expressão dos genes *GADD34* (p=0,02), *CHOP* (p=0,0001) e *SDF2* (p=0,03) nos explantes, após 24h de tratamento com soro PE quando comparado ao grupo controle. A expressão gênica

de ATF4 e *sXBP1* não apresentou alteração. Ocorreu aumento significativo da expressão proteica de GRP78 (p=0,02), SDF2 (p=0,007), p-eIF2α (p=0,01) e a razão p-eIF2α/eIF2α (p=0,0006) nos explantes tratados com soro PE em comparação com o controle. Não houve alteração significativa na expressão de eIF2α total. As células HTR-8/Sv-neo apresentaram mais mortes após 12h (0,007) e 24h (p=0,007) de tratamento com soro PE quando comparadas com o grupo controle (soro saudável). A expressão gênica de GADD34 (12h: p=0,0001; 24h: p=0,006), CHOP (12h: p<0,001; 24h: p<0,01) e SDF2 (p<0,0001) ATF4 (p<0,0001) aumentaram significativamente após 24h de tratamento com soro PE quando comparada ao controle. Um aumento significativo na expressão proteica de eIF2α total foi observado após 12h (p=0,016) e expressão proteica de p-eIF2α foi significativamente maior após 6h (p=0,034) e 12h (p=0,012) de tratamento do soro PE comparadas com seus respectivos controles. A razão p-eIF2α/eIF2α foi significativamente maior após 6h de tratamento (p=0,007). A expressão proteica de SDF2 foi maior em 12h (p=0,01) e 24h (p=0,01) em relação ao grupo controle. Este estudo pode oferecer novas perspectivas na compreensão da PE, na medida em que avalia se o ambiente materno fornecendo evidencias de que o soro de mulheres gestantes com PE possui fatores desencadeante de estresse de RE e de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) nos vilos placentários.

Palavras-chave: Placenta. Células trofoblásticas. Pré-eclâmpsia. Estresse de RE, UPR.

ABSTRACT

CASTRO, KR. *Effect of serum from pregnant women with pre-eclampsia on the endoplasmic reticulum stress pathway in trophoblastic cells [thesis]*. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

It is in the endoplasmic reticulum that protein synthesis, folding and maturation occurs, which is an organelle extremely sensitive to variations in stimuli that may interfere with cell homeostasis. When there is an unfavorable environment or greater demand for protein synthesis, a failure in protein folding occurs and an accumulation of poorly folded proteins begins, leading the cell to Endoplasmic Reticulum Stress (ER). In response, activation of the signaling pathway known as the response to malfolded proteins occurs Unfolded Protein Response (UPR). If URP fails to restore cellular homeostasis, the pathway itself activates mechanisms that lead to apoptosis, preventing the cell from secreting non-functional molecules to the extracellular environment. UPR has been studied in several pathophysiology such as neurodegenerative diseases and diabetes and, in pregnancy, early pre-eclampsia (PE). In PE, there is an imbalance in the synthesis and release of placental factors associated with a systemic maternal response that consists of generalized vascular inflammation. Evidence shows a relevance in this imbalance of placental products in the pathogenesis of PE. In this study, we evaluated the effect of the serum of PE pregnant women on the ER stress pathway in chorionic explants of healthy term placentas, treated with serum from healthy pregnant women (control) and with PE for 24h and in HTR-8/Sv-neo cells for 3h, 6h, 12h and 24h. The sFlt-1/PlGF ratio was higher in the serum of pregnant women with PE (p=0.02). After 24h of treatment with PE serum, placental explants showed a reduction in cell metabolism and cell viability (p=0.007) had more deaths when compared to control (p=0.01). There was a significant increase in the expression of the GADD34 (p=0.02), CHOP (p=0.0001) and SDF2 (p=0.03) genes in the explants, after 24h of treatment with PE serum when compared to the control group. The gene expression of ATF4 and sXBP1 did not change. There was a significant increase in GRP78 protein expression (p=0.02),

SDF2 (p=0.007), p-eIF2α (p=0.01) and the p-eIF2α/eIF2α ratio (p=0.0006) in explants treated with PE serum compared to the control. There was no significant change in the expression of total eIF2α. HTR-8/Svneo cells showed more deaths after 12h (0.007) and 24h (p = 0.007) of treatment with PE serum when compared to the control group (healthy serum). Gene expression of GADD34 (12h: p=0.0001; 24h: p=0.006), CHOP (12h: p<0.001; 24h: p<0.01) and SDF2 (p<0.0001) ATF4 (p<0.0001) increased significantly after 24h of treatment with PE serum when compared to the control. A significant increase in total eIF2α protein expression was observed after 12h (p=0.016) and p-eIF2α protein expression was significantly higher after 6h (p=0.034) and 12h (p= 0.012) of PE serum treatment compared with their respective controls. The p-eIF2α/eIF2α ratio was significantly higher after 6 hours of treatment (p=0.007). Protein expression of SDF2 was higher in 12h (p=0.01) and 24h (p=0.01) in relation to the control group. This study may offer new perspectives in the understanding of PE, as it assesses whether the maternal environment providing evidence that the serum of pregnant women with PE has triggering factors for ER stress and response to poorly folded proteins (UPR) in villi placental.

Keywords: Placenta. Trophoblastic cells. Pre-eclampsia. RE stress. UPR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Remodelação das artérias espiraladas e invasão citotrofoblásticas.....44

Figura 2 - Fatores angiogênicos e anti-angiogênicos presentes na circulação materna na gestação saudável e na pré-eclâmpsia.....49

Figura 3 - Ativação da via de Estresse de RE.....53

Figura 4 - Expressão dos fatores vasoativos sFlt1 e PlGF no soro de pacientes saudáveis (barras brancas) e de PE (barras pretas).....85

Figura 5 - Relação entre atividade metabólica e quantidade de tecido *versus* quantidade de proteínas extraídas.....86

Figura 6 - Redução da atividade metabólica dos explantes coriônicos de gestantes saudáveis tratados com soro de gestantes PE (SPE).....87

Figura 7 - Níveis de LDH liberados pelos explantes coriônicos após tratamento com soro de gestantes saudáveis (PS-SS) e com PE (PS-SPE), por 24 horas.....88

Figura 8 - Expressão gênica dos marcadores de extresse de RE nos explantes coriônicos de gestantes saudáveis tratados com soro saudável (SS) e PE (SPE).....89

Figura 9 - Expressão protéica de GRP78, p-eIF2α e eIF2α total e, SDF2 nos explantes coriônicos, avaliada por *Western Blotting*.....91

Figura 10 - Níveis de LDH liberados pelas células HTR-8/Sv-neo após tratamento com soro de gestantes saudáveis (HTR8-SS-12H) e com PE (HTR8-SPE-24H), por 12h e 24h.....93

Figura 11 - Expressão gênica de *GADD34, CHOP, GADD34* e *SDF2* em células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo tratadas com soro saudável (SS) e PE (SPE) por 12h e 24h.....95

Figura 12 - Expressão proteica (*Western Blotting)* de p-eIF2α e eIF2α total nas células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo tratadas com soro de gestantes saudáveis e PE por 3h, 6h, 12h e 24h.....97

Figura 13 - Expressão proteica de SDF2 nas células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo cultivadas com soro de gestantes saudáveis (SS) e com PE (SPE) por 3, 6, 12 e 24h.....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers e condições de amplificação.....75

Tabela 2 – Anticorpos primários e diluições.....77

Tabela 3 – Anticorpos secundários e diluições.....77

Tabela 4 – Características clínicas e desfechos gestacionais das pacientes saudáveis e com PE.....84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang – angiopoietina

ATF-6 – *activating transcription factor 6*

ATF4 – *Activating Transcription Factor 4*

ATP – adenosina trifosfato

Bcl-2 – *B cell CLL/lymphoma-2*

BiP – *Binding Protein*

CALR – calreticulina

CHOP – *transcription factor C/EBP homologous protein*

CTEN – citotrofoblasto extraviloso endovascular

DMSO – sulfóxido de dimetilo

eIF2α – fator de iniciação da tradução eucariótico 2α

ERAD – *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*

EROS – espécies reativas de oxigênio

GADD34 – *growth-arrest DNA damage gene 34*

GRP – *glucose-regulated protein*

hCG – gonadotrofina coriônica humana

HELLP – hemólise, enzimas hepáticas elevadas, baixa contagem de plaquetas

HIF-1 – fator indutor de hipóxia

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HLA – antígenos leucocitários humanos

hPL – hormônio lactogênico placentário

HSP70 – *heat chock protein* 70

IFNγ – interferon gama

IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina

IL – interleucina

IRE-1 – *inositol-requiring enzyme 1*

ISSHP – *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*

LDH – lactato desidrogenase

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

mTOR – *mammalian target of rapamicin*

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NFκB – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK – célula *natural killer*

NO – óxido nítrico

PBS – tampão fosfato-salina

PE – pré-eclâmpsia

PERK – *protein Kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*

PlGF – fator de crescimento placentário

RCF - restrição do crescimento fetal

RE – retículo endoplasmático

SDF2 – *Stromal Cell Derived Factor 2*

SDF2L1 – *Stromal Cell Derived Factor 2-like1*

sFlt-1 – tirosina 1 semelhante a fms solúvel

TGFβ-1 – fator transformante de crescimento beta-1

Th – célula T *helper*

TNFα – fator de necrose tumoral alfa

UPR – Unfolded Protein Response

VEGF – fator de crescimento endovascular

VEGFR – receptor do fator de crescimento endovascular

XBP-1 – *x-box binding protein*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....26

2 REVISÃO DE LITERATURA.....32

2.1 PRÉ-ECLÂMPSIA.....33

2.1.1 DEFINIÇÃO CLÍNICA.....33

2.1.2 Fatores de risco.....37

2.1.3 Mecanismos de desenvolvimento da PE.....42

2.1.3.1 Primeiro estágio: placentação anormal e invasão trofoblásticas.....43

2.1.3.2 Segundo estágio: Desenvolvimento da síndrome materna.....47

2.2 O estresse de Retículo endoplasmático.....51

2.2.1 Mecanismos de sobrevivência, a placenta e o estresse de RE.....56

2.2.2 O estresse de RE e a PE.....57

3 JUSTIFICATIVA.....62

4 OBJETIVOS.....64

4.1 Objetivo Geral.....65

4.2 Objetivos Específicos.....65

5 MATERIAL E MÉTODOS.....66

5.1 Procedências dos reagentes.....67

5.2 Amostras de sangue.....68

5.3 Produção de fatores vasoativos.....69

5.4 Análise do efeito do soro de gestante PE sobre os explantes coriônicos..69

5.4.1 Cultivo dos explantes placentários e tratamento com soro de gestantes saudáveis e com PE.....69

5.4.2 Ensaio atividade metabólica por MTT.....71

5.4.3 Ensaio atividade citotóxica por LDH.....71

5.4.4 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (q-PCR).....72

5.4.4.1 Extração de RNA dos explantes coriônicos.....72

5.4.4.2 Remoção do DNA genômico.....73

5.4.4.3 Síntese de cDNA.....74

5.4.4.4 Real Time qPCR.....74

5.5 Análise da expressão proteica por Western Blotting.....75

5.6 Análise do efeito do soro de gestante PE sobre as linhagens trofoblásticas HTR-8 Svneo.....77

5.6.1 Cultivo das linhagens trofoblásticas HTR-8 SVneo e tratamento com soro de gestantes saudáveis e PE.....77

5.6.2 Ensaio atividade citotóxica por LDH.....78

5.6.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (q-PCR).....78

5.6.3.1 Preparação das mostras para RT-qPCR 78

5.6.3.2 Real Time qPCR.....79

5.6.4 Análise da expressão proteica por Western Blotting.....79

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....80

7 RESULTADOS.....82

7.1. Características clínicas do estudo da população.....83

7.2 Expressão dos fatores vasoativos sFlt1 e PlGF no soro das gestantes saudáveis/PE.....84

7.3 Avaliação dos efeitos do soro de gestantes com PE sobre os explantes coriônicos de gestantes saudáveis.....85

7.3.1 Atividade metabólica.....85

7.3.2 Atividade citotóxica.....87

7.3.3 Ativação da via de estresse de RE nos explantes coriônicos tratados com soro PE.....88

7.3.3.1 Expressão gênica dos marcadores de estresse de RE.....88

7.3.3.2 Expressão proteica dos marcadores de estresse de RE...90

7.4 Avaliação dos efeitos do soro de gestantes com PE sobre as células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo.....92

7.4.1 Efeitos citotóxicos do soro de gestantes sobre sobre as células HTR-8/SV-neo.....92

7.4.2 Ativação da via de estresse de RE nas células HTR-8/Sv-neo tratadas com soro de gestantes PE.....93

7.4.2.1 Expressão gênica dos marcadores de estresse de RE.....93

7.4.2.2 Expressão proteica dos marcadores de estresse de RE...96

8 DISCUSSÃO……...……...……100

9 CONCLUSÕES……...……114

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……...……116

1 INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão materno-fetal transitório e multifuncional que desempenha funções respiratórias, nutritivas, excretoras e imunológicas, além de produzir hormônios necessários para o sucesso da gestação (Evain-Brion e Malassine, 2003).

O componente materno da placenta é formado por células que se diferenciam a partir dos fibroblastos da camada funcional do endométrio e que em conjunto formam a decídua basal. Embora diferenciação decidual também ocorra em outras regiões (decídua capsular e parietal, não associadas ao local de implantação embrionária) é a decídua basal que mantem contato com a porção fetal da placenta – os vilos coriônicos e o trofoblasto extraviloso - e é também denominada de placa basal (Wynn, 1967).

Os vilos coriônicos são formados por um eixo de tecido mesenquimal vascularizado e com macrófagos, revestido por células trofoblásticas individualizadas – citotrofoblasto - e uma camada sincicial, - o sinciciotrofoblasto. Nas fases gestacionais mais adiantadas, há escasseamento das células do citotrofoblasto. Ao longo da gestação, os vilos coriônicos se ramificam intensamente e sua superfície sincicial faz contato com o sangue materno, extravasado nos espaços intervilosos. A superfície do sinciciotrofoblasto em contato com o sangue materno é responsável pelas trocas moleculares, gasosas e nutritivas entre os organismos materno e fetal (Kaufmann, 1985).

Na extremidade distal dos vilos coriônicos, células citotrofoblásticas proliferam, rompem o revestimento sincicial e passam a interagir diretamente com os componentes deciduais. Estas células trofoblásticas assumem diferentes morfologias e funções, caracterizando subtipos de células denominadas de citotrofoblásticas extravilosas e são consideradas de fundamental importância para a homeostase metabólica, imunológica e funcional da gestação (Tarrade et al., 2001).

Em um primeiro momento, as células citotrofoblásticas bloqueiam as extremidades das artérias uterinas espiraladas, impedindo o fluxo sanguíneo arterial nos espaços intervilosos (Jaffe, Jauniaux e Hustin, 1997). Neste período, estas

artérias passam por extenso processo de remodelamento das quais participam células citotrofoblásticas extravilosas e outros componentes endometriais como as abundantes células *NK* presentes no endométrio (Rätsep et al., 2015). As células do citotrofoblasto extraviloso substituem as células endoteliais e musculares vasculares formando canais vasculares que levam a uma circulação placentária de alto fluxo e baixa resistência, garantindo uma perfusão mais abundante e regular no espaço interviloso (Granger et al., 2001). A abertura destes canais no espaço interviloso ocorre ao redor da 12ª semana de gestação.

Especialmente a partir do 2º trimestre de gestação, o fluxo sanguíneo adequado na interface materno-fetal está intimamente associado à vasodilatação da circulação uterina, que em parte é assegurada também pelos canais vasculares trofoblásticos (Brosen et al.; Robertson, Brosen e Dixon, 1967). A produção de fatores vasodilatadores por células endoteliais uterinas e de toda a circulação sistêmica é aumentada durante a gestação, assim como a resposta a estes fatores também parece ser mais efetiva (Poston et al., 1995, Bird, Zhang e Magness, 2003). Falhas nos mecanismos de vasodilatação e nas funções endoteliais são encontradas em doenças hipertensivas gestacionais (Morton, Care e Davidge, 2017).

As consequências destas doenças se fazem sentir tanto no feto como na gestante. Em geral, acredita-se suas implicações fetais incluam hipóxia fetal, restrição de crescimento fetal (RCF), nascimento prematuro e até óbito fetal (Sibai, 2002; Bramham et al., 2014).

Várias classificações são descritas para os distúrbios hipertensivos na gravidez, entre elas, destacamos aqui a pré-eclâmpsia (PE), a eclampsia e a síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas, baixa contagem de plaquetas), por serem as patologias gestacionais que causam os maiores riscos de mortalidade e morbidade materna e perinatal (ACOG Practice Bulletin, 2019). Estas desordens de incidência mundial, também podem limitar a saúde materna e determinar graves consequências ao feto e ao recém-nascido. No Brasil, as síndromes hipertensivas da gestação são as principais causas de morte materna

principalmente quando apresentadas em suas formas mais graves: eclampsia e síndrome HELLP (Queiroz, 2018).

Neste estudo, abordamos apenas a PE. Estima-se que esta desordem afete 4% a 5% das gestantes em todo o mundo (Phipps et al., 2019) e no Brasil, 1,5% (Abalos et al., 2013). Além da hipertensão arterial, a PE se caracteriza também por proteinúria, ocorrendo na segunda metade da gestação, associada ao aumento de inflamação sistêmica (Redman e Sargent, 2004). A forma mais grave da PE ocorre em cerca de 0,5% das gestações. Se expressa precocemente, podendo ser diagnosticada após a 20ª semana de gestação e está associada à restrição do RCF (Staff et al., 2013).

Ainda há necessidade de muitos estudos para que possamos entender as origens da PE; no entanto há um consenso de que as causas devem ser multifatoriais (Redman e Sargent, 2005). A remoção da placenta é a única forma conhecida de abrandar os sintomas, sugerindo que fatores liberados pelo trofoblasto atuam sobre o organismo materno de gestantes suscetíveis (Huppertz, 2008; Roberts e Escudero, 2012; Huppertz, 2015).

Principalmente a PE de início precoce tem sido atribuída à invasão superficial do trofoblasto extraviloso na decídua, levando a uma remodelação das arterias uterinas de forma deficitária e consequentemente a um fluxo sanguíneo útero-placentário inadequado. A remodelação deficiente das artérias espirais uterinas por sua vez, causam perfusão errática na interface materno-fetal, com ondas de isquemia e reperfusão, levando a estresse oxidativo (Osol, Ko e Mandalà, 2017) e desbalanço na produção de fatores antiangiogênicos pelo trofoblasto (Sankaralingam et al., 2006), o que se acredita que seja um fator crucial para a disfunção endotelial e inflamação no organismo materno.

Distúrbios como hipóxia e deprivação de nutrientes, como os que acontecem na pré-eclâmpsia também podem afetar a síntese protéica, alterando a estruturação de proteínas no retículo endoplasmático, evento celular conhecido como estresse do retículo endoplasmático (RE) (Walter e Ron, 2011). Em geral, insultos celulares com comprometimento do RE levam à produção de proteínas mal-enoveladas no lúmen do RE, que por suas alterações não prosseguem seu destino de secreção,

acumulando-se neste lúmen (Walter e Ron, 2011). O estresse do RE ativa multiplas respostas celulares com o intuito de resgatar a homeostasia celular ou induzir a apoptose da célula injuriada, impedindo a secreção de proteinas inativas ou corrompidas (Xu, Bailly-Maitre e Reed, 2005). Esta resposta em conjunto é denominada de “resposta a proteinas mal enoveladas” (UPR, do inglês, ***u**nfolded **p**rotein **r**esponse*) (Schröder e Kaufman, 2005; Walter e Ron, 2011) e inclui a inibição da síntese proteica, diminuição da proliferação celular, ativação de respostas pró-inflamatórias e morte celular com prejuízo das funções orgânicas e teciduais (Yung et al. 2008; Sano e Reed, 2013). Estudos prévios mostraram que ocorre ativação da via UPR em placentas de mulheres com PE de início precoce, portanto grave (Yoshida, 2007; Burton e Yung, 2011). Estudos recentes também mostraram que a proteina SDF2 está estreitamente associada à via UPR (Lorenzon et al., 2010), particularmente quando esta via ativa processos de morte celular (Lorenzon et al., 2014). Além disso, também se observou aumento de sua expressão nos casos mais severos desta doença (Lorenzon et al., 2020).

A fisiopatologia da PE tem sido bastante discutida, assim como os fatores que agravam o estado inflamatório e de saude geral da gestante. Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que o soro de gestantes com PE altera o perfil de expressão gênica dos fatores angioativos como o fator de crescimento placentário (PlGF) e da tirosina 1 semelhante a fms solúvel (sFlt-1) por vilos coriônicos de gestantes saudáveis (Prado, 2019). A alteração de expressão e secreção destes fatores tem sido considerados biomarcadores da PE (Monte, 2011; Mathur et al., 2016; Tomimatsu et al., 2019). Neste contexto, estes resultados parecem indicar que pode haver um mecanismo de retroalimentação crônico como fator de agravamento da doença. Não está claro, no entanto, se fatores circulantes maternos gerados durante a PE grave podem atuar nas células da placenta, ativando mecanismos de estresse e levando à um agravamento da PE. Propomos que este seja um mecanismo que pode contribuir para os sintomas clínicos de agravamento da pré-eclâmpsia. Mais especificamente, este estudo tem como proposta avaliar se fatores presentes no soro materno exercem efeito sobre as células trofoblásticas ativando a via de estresse de RE e desequilibrando a expressão dos produtos

vasoativos que caracterizam o ambiente pré-eclâmptico. Uma vez ativada, essa via exacerba a resposta inicial desencadeante da patologia, fazendo com que a resposta ao insulto patológico seja ao mesmo tempo indutor e agravante da PE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pré-eclâmpsia

2.1.1 Definição clínica

Embora a pré-eclâmpsia/eclâmpsia não tenha sido formalmente classificada como um distúrbio da gravidez durante os tempos antigos, escritos da Grécia antiga mostram que o conceito de eclâmpsia era conhecido. Hipócrates (400 a.C.) afirmava que uma dor de cabeça, aumento de peso e convulsões durante a gravidez era um mau prognóstico (revisto por Bell, 2010).

Apenas em 1619 a palavra “eclampsia” aparece no Tratado de Ginecologia de Varandaeus (Ong, 2004). No entanto, o primeiro obstetra a descrever sistematicamente a eclampsia e a notar que primigestas apresentavam maior risco de convulsões em comparação às multigestas, foi o francês François Mauriceau. Mauriceau entretanto, atribuiu as convulsões a anormalidades na perda sanguínea pós-parto ou na morte fetal intrauterina. Segundo suas interpretações, a ausência de fluxo sanguíneo pós-parto estaria associada a inflamação, dores na cabeça, convulsões, asfixia e morte. No caso de morte fetal intrauterina, o feto morto e retido exalava humores fétidos e cadavéricos no útero, predispondo a mulher a convulsões (revisto por Bell, 2010).

A definição das condições clínicas associadas à PE e eclâmpsia continuou a ser aperfeiçoada à medida que os sinais e sintomas clássicos se tornavam mais facilmente reconhecidos. Primeiramente, identificaram a presença de edema e logo depois incluíram presença da albumina na urina (Chesley, 1984). Além disso, também identificaram que estes sintomas surgiam no final da gestação acompanhados de dores de cabeça, perda temporária da visão, dor intensa no estômago e edema das mãos, braços, pescoço e rosto (Johns, 1843). Entretanto, somente no final do século XIX a hipertensão foi associada à PE e eclâmpsia (Chesley, 2015). O estado pré-eclâmptico foi então classificado de acordo com a presença de edema, proteinúria e dores que cabeça que poderiam progredir para convulsão (Chesley, 2015).

Em meados do séc. XX, a PE e eclâmpsia foi classificada como toxemia aguda da gravidez. Os critérios para o diagnóstico de PE e eclâmpsia incluíam hipertensão, edema ou proteinúria após a 24a semana de gestação (Dexter, 1943).

Com o passar dos anos, o termo toxemia da gravidez foi substituído por distúrbios hipertensivos da gravidez recebendo uma nova classificação que incluiu o desenvolvimento de hipertensão com proteinúria, edema ou ambos com início após 20 semanas de gestação (Sullivan, 1974).

Em 1988, a classificação da PE passou por mais uma revisão e foi agrupada sob o termo hipertensão induzida pela gravidez e foi classificada como leve pela presença de hipertensão e edema, enquanto a pré-eclâmpsia grave foi classificada pela presença de hipertensão e proteinúria com ou sem edema ou distúrbios cerebrais ou visuais (Hibbard, 1988).

Diante de manifestações clínicas incertas e as diferenças observadas nos distúrbios hipertensivos gestacionais, particularmente na PE, a Sociedade Internacional de Estudos sobre Hipertensão na Gravidez (ISSHP, do inglês: *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*), em 2000, reconheceu a necessidade de um consenso definitivo sobre os critérios de classificação e diagnóstico (Tranquilli et al., 2014).

A partir destes critérios, a classificação da hipertensão gestacional e da PE baseia-se no desenvolvimento de hipertensão arterial (> 140 mmHg sistólica ou > 90 mmHg diastólica) após 20 semanas de gestação. No entanto, é aconselhado que seja avaliada a pressão arterial da gestante entre 16 e 20 semanas afim de averiguar se há hipertensão crônica prévia a gestação (Tranquilli et al., 2014).

Após o diagnóstico de hipertensão arterial, o próximo passo é diferenciar hipertensão gestacional ou PE. A pré-eclâmpsia deve estar associada a proteinúria, ou a disfunções maternas em órgãos-alvo que podem determinar insuficiência renal (creatinina > 90 μmol/L; 1,02 mg/dL); disfunção hepática (aumento dos níveis de transaminases) ou dor abdominal epigástrica; complicações neurológicas como eclâmpsia, estado mental alterado, cegueira, acidente vascular cerebral entre outros; complicações hematológicas (trombocitopenia - contagem de plaquetas

abaixo de 150.000/dL, coagulação intravascular disseminada, hemólise) ou ainda, disfunção uteroplacentária, evidenciada pela RCF (Tranquilli et al., 2014).

A proteinúria é caracterizada pela perda de 300 mg ou mais de proteína na urina em um período de 24 horas. Para maior agilidade no diagnóstico é indicado que sejam realizadas avaliações em amostras isoladas de urina relacionando proteinúria/creatininúria (≥300mg/24 horas) (Ramos, Sass e Costa, 2017). Nem sempre as gestantes diagnosticadas com pré-eclâmpsia apresentarão proteinúria, no entanto, apresentam manifestações hepáticas, hematopoéticas ou outras manifestações.

Tranquilli et al. (2014) e Brown et al. (2018) revisaram as classificações das síndromes hipertensivas na gestação realizada pela ISSHP que podem ser classificadas como:

- **Hipertensão arterial crônica (hipertensão preexistente):** ocorre quando a gestante apresenta aumento dos níveis pressóricos (≥ 140/90 mmHg) antes da gestação ou quando detectada no 1º trimestre da gestação ou até a 20ª semana de gestação, sem retorno a níveis normais após o parto.
- **Hipertensão crônica gestacional:** ocorre o aumento dos níveis pressóricos (≥ 140/90 mmHg) pela primeira vez após a 20ª semana de gestação, sem proteinúria, em mulheres previamente normotensas. A PE não se desenvolve e a pressão sanguínea retorna ao normal após12ª semanas após o parto.
- **Pré-eclâmpsia**: ocorre quando a paciente apresenta, após 20ª semana de gestação, aumento dos níveis pressóricos (≥ 140/90 mmHg) associada com a proteinúria (≥ 300mg/24 h) em duas amostras de urinas com intervalo de 4h. Na ausência de proteinúria, pode haver associação de sintomas neurológicos e visuais, edema de pulmão ou cianose, plaquetopenia (<100.000/uL), dor epigástrica ou no quadrante superior direito, alterações das enzimas do fígado, diurese ou oligúria e RCF. Além disso, a PE também é classificada de acordo com o período em que é realizado o diagnóstico, como por exemplo, PE precoce, nos casos em que a gestante é diagnostica

antes de 34 semanas de gestação e está associada a extensas lesões vilosas e vasculares da placenta, causando grandes riscos de complicações maternas e fetais. A PE é classificada como tardia quando o diagnóstico ocorre após 34 semanas de gestação. Nestas gestantes, a placenta apresenta mínimas lesões e, os fatores maternos, como síndrome metabólica, hipertensão desempenham papéis de maior importância.

A PE também pode ser classificada de acordo com os sintomas e gravidade apresentada por cada gestante.

- **PE grave**: caracterizada pela presença de altos níveis pressóricos (≥ 160/110 mmHg), proteinúria significativa (≥ 5g/24 h) e oligúria (< 400 mL/24 h) após a 20ª semana de gestação em duas amostras de urinas com intervalo de 4h e associadas a distúrbios graves persistentes como alterações visuais, cerebrais, edema de pulmão ou cianose, plaquetopenia (<100.000/uL), oliguria ou diurese, dor epigástrica ou no quadrante superior direito, insuficiência renal, lesão hepática e RCF. É considerada uma forma mais grave, pois apresenta maior risco de mortalidade perinatal e materna, maior taxa de RCF e está associada a lesões mais severas na placenta (Staff et al., 2013).
- **PE leve:** caracterizada pelo aumento dos níveis pressóricos (≥ 140/90 mmHg) associada com a proteinúria (≥ 300mg/24 h) avaliadas em amostras de urina espaçada em 4h, após 20ª semana de gestação, porém neste caso, a paciente não apresenta as complicações observadas nos casos de pré-eclâmpsia grave.
- **PE superajuntada**: caracterizada pela presença de hipertensão arterial prévia a 20ª semana de gestação associado à proteinúria (anteriormente ausente), ou às disfunções metabólicas observadas em casos de pré-eclâmpsia grave (Bittar et al., 2012).

Atualmente, considera-se que a pré-eclâmpsia de início precoce e tardio tem diferentes fisiopatologias (revisto por Armaly et al., 2018). A de início precoce ou pré-eclâmpsia placentária, envolve a redução na remodelação das artérias espiraladas maternas no início da gestação, má perfusão placentária e à modificação morfológicas e moleculares dos tecidos placentários. Dentre estas modificações, destaca-se o estresse oxidativo que leva ao aumento da expressão de sFLT-1 e redução do PlGF (biomarcadores de PE).

Na pré-eclâmpsia de início tardio, também chamada de pré-eclâmpsia materna, não ocorrem alterações na remodelação das artérias uterinas, assim como a perfusão placentária não se modifica e pode até mesmo estar aumentada (Yung et al., 2008; Sohlberg et al., 2014;). Nestas placentas, o estresse oxidativo é discreto e a secreção placentária de sFlt-1 e PlGF se mantem próxima dos níveis normais. Estes casos representam aproximadamente 80% dos casos de PE, e se acredita se devam a uma predisposição genética materna para doenças cardiovasculares, manifestada durante a gestação como PE (Armaly et al., 2018).

Como neste estudo foram analisados apenas casos de PE precoce e grave, daqui em diante daremos mais ênfase aos dados referentes a esta desordem.

2.1.2 Fatores de Risco

É de extrema importância que uma paciente com PE seja diagnosticada o mais breve possível. Medidas preventivas podem ser realizadas identificando os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de uma placentação inadequada.

Até o momento, vários fatores de risco associados ao desenvolvimento da PE grave foram descritos na literatura. Apesar da complexidade da fisiopatologia da PE, alguns fatores foram relacionados com o desenvolvimento da doença e classificados como: fatores específicos da gestação, condições maternas pré-existentes e fatores ambientais externos. Alguns destes fatores serão detalhados em conjunto a seguir.

Primeira gestação

A pré-eclâmpsia geralmente ocorre em mulheres jovens que têm a primeira gestação (Sibai e Dekker, 2005). Acredita-se que ser primigesta é uma condição que predispõe o desenvolvimento da PE e isto seria o mecanismo chave para o desencadeamento do processo fisiopatológico da PE. No entanto, o efeito inverso protetor da multiparidade não se mantém quando há mudança de parceiro (Li e Wi, 2000).

O risco de PE parece aumentar entre mulheres que foram expostas a um curto período de tempo aos antígenos paternos presente no líquido seminal. Acredita-se que neste caso, o sistema imunológico materno responda de maneira inadequada aos antígenos fetais, contribuindo assim, para uma invasão ineficiente das artérias espiraladas pelas células trofoblásticas extravilosas (Deen et al., 2006; Redman e Sargent, 2010). Estudos em modelos animais, mostraram que o contato repetitivo do sêmen no trato genital feminino aciona cascatas celulares e moleculares, desencadeadores de reações inflamatórias, o que poderia predispor o sistema imune materno a uma hiporesponsividade e tolerância aos antígenos compartilhados pelo feto (Robertson et al., 2002, Robertson, Bromfield e Tremellen, 2003).

Após a primeira gestação complicada por PE, o risco desenvolver PE em uma próxima gestação é de aproximadamente 20%, mas pode variar até 80% dependendo da gravidade da gestação anterior (Bartsch et al., 2016). Os maiores riscos de recorrência estão relacionados com gestações que resultaram em parto prematuro, PE grave, eclâmpsia, síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixa contagem de plaquetas) ou RCF (Dildy, Belfort e Smulian, 2007; Melamed et al., 2012; Malmström e Morken, 2018).

Gestações gemelares

Estudos anteriores também mostraram que gestações gemelares aumentam risco de desenvolver PE (Francisco et al., 2017), independentemente de a gestação ser univitelina ou bivitelina (Savvidou et al., 2001; Lučovnik et al., 2016). A incidência de PE nestas gestações é de 25 a 30% dos casos, com o parto ocorrendo antes de 37 semanas de gestação (Wright et al., 2015). Ao contrário, uma gestação tripla parece triplicar o risco de PE em comparação com uma gestação gemelar (Skupski et al., 1996).

Idade acima de 35 anos

A PE também parece estar relacionada com gestações em mulheres com idade acima dos 35 anos. Lamminpää et al. (2012) identificaram índices de PE maiores (9,6%) nas mulheres acima de 35 anos em relação às mulheres jovens (6,4%). Também mostraram taxas mais altas de parto prematuro, baixos índices de APGAR aos 5 minutos, recém-nascidos pequenos para a idade gestacional, asfixia, parto cesárea e internação em unidade de terapia intensiva.

Similarmente, em um estudo transversal recente, Sheen et al. (2020) avaliou gestantes entre 15 e 54 anos submetidas a hospitalizações de parto de 1998 a 2014 com diagnóstico de pré-eclâmpsia, eclâmpsia ou ambas. A proporção de mulheres com pré-eclâmpsia de 15 a 24 anos diminuiu de 42,3% em 1998 para 30,1% em 2014, enquanto a pré-eclâmpsia entre os 30 e 54 anos aumentou de 32,9 para 43,7%. Este estudo enfatizou, desta forma, o papel das mulheres mais velhas no índice crescente de diagnósticos de PE, apesar das mulheres mais jovens terem um risco maior de evoluírem para eclâmpsia. Outro estudo multicêntrico retrospectivo também constatou que a idade materna avançada está associada a um risco elevado de nascimento prematuro (< 28 semanas) em gestantes com PE precoce e, que gestantes com idade menor que 25 anos com PE precoce e tardia tem risco elevado de baixo peso ao nascer e pequeno para idade gestacional (Li et al., 2018).

Obesidade

O estudo de coorte realizado por Bartsck et al. (2016) mostrou que gestantes com IMC >30 tem maior risco de PE. Essa relação foi encontrada tanto em gestantes com PE precoce ou grave quanto em gestantes com PE tardias ou leves. A obesidade é considerada um fator de risco para a PE, na medida em que apresenta muitos mecanismos comuns com o desenvolvimento da PE (Spradley, Palei e Granger, 2015). O excesso de ganho de peso durante a gestação ou pré-gestação pode estar associado ao hiperinsulinismo, resistência à insulina e inflamação sistêmica materna tem sido proposto como um dos mecanismos que leva à disfunção endotelial, hipertensão, proteinúria, trombofilias, dano a múltiplos órgãos e comprometimento cardiovascular, como os observados na PE (Walker, 2000; Wolf et al., 2002; Brown et al., 2013; Lopez-Jaramillo et al., 2018).

Histórico familiar e genes relacionados

O desenvolvimento da PE, especialmente em parentes de primeiro grau, tanto do lado materno ou paterno, aumenta o risco de PE (Carr et al., 2005).

Cincotta e Brennecke (1998) avaliou o risco de primigestas filhas ou irmãs de mulheres que desenvolveram PE durante a gestação e concluiu que uma primigesta com história familiar de PE está associada a um risco 4 vezes maior de desenvolver PE grave. Estudo realizado no Brasil também obteve resultados semelhantes (Bezerra et al., 2010).

Vários casos de PE na mesma família sugerem um componente genético contribuindo para o desenvolvimento anômalo da placenta (Nilsson et al., 2004; Skjaerven et al., 2005). O gene STOX1 foi inicialmente identificado como susceptível à PE, uma vez que prevalece entre parentes de primeiro grau com PE, em uma forma mutada (van Dijk et al., 2005, 2010; Rigourd et al., 2008). No entanto, estudos com pacientes pré-eclâmpticas mais heterogêneas falharam em confirmar esta relação (Iglesias-Platas et al., 2007; Kivinen et al., 2007).

A PE também tem sido relacionada à presença de polimorfismo em genes que controlam a pressão sanguínea. O polimorfismo em genes que atuam no processo de regulação do sistema renina-angiotensina tem sido um alvo importante de estudo. Níveis aumentados da enzima conversora de angiotensina resultam em aumento da concentração de angiotensina II e, podem levar a disfunção endotelial e desenvolvimento de PE e eclâmpsia (Serrano et al., 2006; Timokhina et al., 2019).

Nas últimas décadas, grande atenção também tem sido dada ao papel que os genes associados à trombofilia podem desempenhar no desenvolvimento da PE. A hipercoagulabilidade desempenha um papel crucial no desenvolvimento da pré-eclâmpsia, na medida em que leva à diminuição da perfusão sanguínea placentária causada por microtrombos nos vasos sanguíneos placentários e, consequente isquemia placentária. A mutação no gene FATOR V DE LEIDEN predispõe seus portadores ao tromboembolismo venoso e arterial. Mulheres que possuem um polimorfismo neste gene têm maiores chances de desenvolverem PE e PE grave (Seremak-Mrozikiewicz et al., 2010; Wang, Rana e Karumanchi, 2014; Ababio et al., 2019).

Outro polimorfismo que vem sendo estudado é o do gene da enzima oxido nítrico sintase, a enzima responsável pela síntese de óxido nítrico (fator envolvido em processos que levam à vasodilatação sistêmica e regulação do fluxo sanguíneo feto-placentário (Morris, Eaton e Dekker, 1996). Singh et al. (2010) relacionou a redução dos níveis de NO com o aumento de citocinas inflamatórias, indicando que podem ser um fator importante no aumento da resistência vascular durante a PE.

Intervalo entre partos

Intervalos prolongados entre partos também parecem favorecer o desenvolvimento da PE. A associação entre o risco de PE e o intervalo entre as gestações com 10 anos ou mais é mais significativa do que a associação entre o risco e a mudança de parceiro (Skjaerven, Wilcox e Lie, 2002).

Doenças pré-existentes

A PE quando somada às doenças maternas preexistentes como diabetes mellitus dependentes de insulina, hipertensão arterial, doença renal e síndrome antifosfolípedes podem contribuir ainda mais para o aumento da morbimortalidade materna e perinatal (Hutcheon, Lisonkova e Joseph, 2011; Bartsch et al., 2016; Shiozaki e Saito, 2018).

2.1.3 Mecanismos de desenvolvimento da PE

A remoção da placenta continua sendo o único tratamento conhecido para esta doença clínica, sugerindo que a placenta é o principal contribuinte para a patogênese da pré-eclâmpsia (Redman e Sargent, 2003). Casos de PE com mola hidatiforme, caracterizada pela ausência do feto, e em gestações extrauterinas, descartam a possibilidade de sua causa estar associada a presença do feto ou de componentes deciduais (Redman, 1991; Hailu et al., 2013; Yoneda et al., 2013; Chouinard et al., 2019).

O desenvolvimento da PE grave é caracterizado por dois estágios (Roberts e Hubel, 2009). O primeiro está associado a placentação anormal evidenciado por um defeito parcial ou total na remodelação das artérias espiraladas pelas células do citotrofoblasto extraviloso, o que, durante o desenvolvimento da placenta, resulta em isquemia. Esta interação anormal entre o citotrofoblasto extraviloso e o endotélio das artérias espiraladas estimula a produção de fatores vasoativos pela placenta, que são liberados na circulação materna. Estes fatores afetam a resistência vascular periférica e a pressão arterial promovendo uma hipoperfusão tecidual generalizada induzindo as manifestações clínicas da doença e, caracterizando assim, o segundo estágio de desenvolvimento da doença (Romero e Chaiworaponga, 2013).

2.1.3.1 Primeiro estágio: placentação anormal e invasão trofoblásticas

Em uma gestação normal, células citotrofoblásticas extravilosas denominadas de endovasculares, invadem a decídua basal e atingem as artérias espiraladas, aonde participam de processo de remodelação destas estruturas vasculares. Neste processo ocorre a substituição das células vasculares endoteliais e dos seus componentes da camada média – fibras musculares lisas e fibras elásticas - por células do trofoblasto extraviloso endovascular (Brosen et al., 1972). Esta remodelação se inicia na porção decidual das arteríolas, por volta da 8º semana de gestação até que quase todas as artérias nesta região sejam modificadas (**Figura 1C**). Este processo se continua na porção miometrial destas artérias, de modo que, na 14ª semana de gestação, já houve substituição dos componentes vasculares arteriais pelo citotrofoblasto (Pijnenborg et al., 1983).

Na PE todo este processo é prejudicado. Em relação à gestação normal (**Figura 1B**), a invasão citotrofoblástica não atinge as regiões uterinas mais profundas, de modo que a remodelação das artérias espiraladas na região do miométrio não ocorre ou é muito deficiente (**Figura 1C**), mantendo os vasos com características não gravídicas (**Figura 1A**). Isto leva a uma condição de alta resistência vascular associada ao estreitamento da parede do vaso e necrose fibrinoide, formando uma lesão denominada de aterose aguda, que leva à isquemia placentária e à síndrome materna da PE (de Wolf, Robertson e Bronsen, 1975; Hecht et al., 2016).

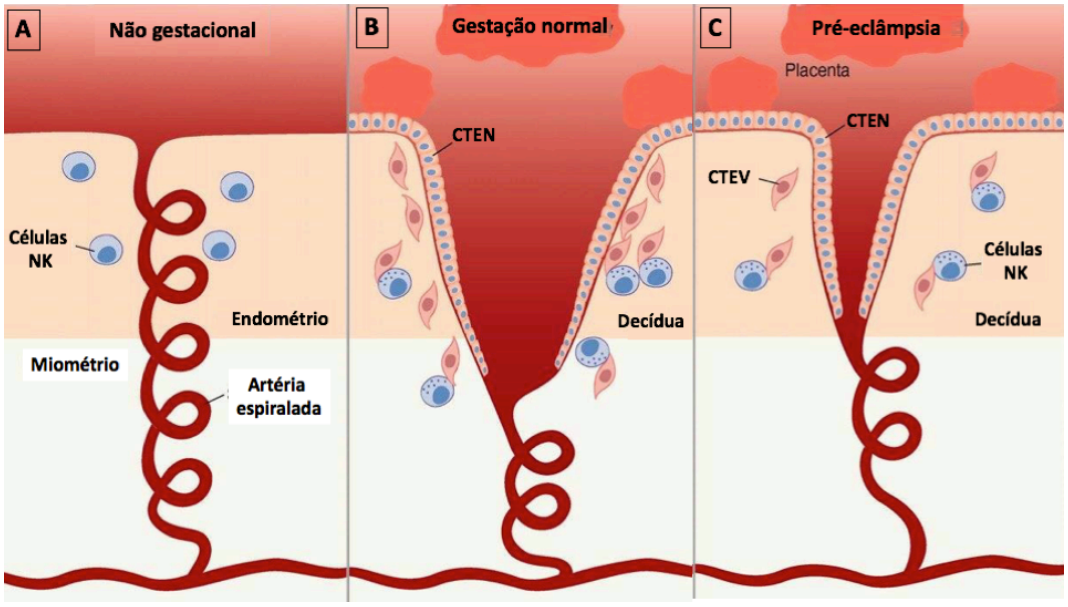


Figura 1 – Remodelação das artérias espiraladas e invasão citotrofoblásticas. A – Útero não gravídico, sem invasão trofoblástica; **B –** Em uma gestação normal, as células do citotrofoblasto extraviloso endovascular (CTEN) invadem as artérias espiraladas maternas e substituem a camada endotelial; **C -** Na PE, não ocorre a invasão citotrofoblástica é ineficiente (CTEN) e não alcança o miométrio, mantendo as artérias espiraladas estreitas e altamente resistentes. (CTEV, citotrofoblasto extraviloso intersticial) (Adaptado de Parham, 2004).

Assim, a redução do fluxo sanguíneo pela conversão prejudicada das artérias espiraladas e/ou pela presença de placas ateróticas e a manutenção da pulsatilidade arterial nestas artérias, leva a um quadro exacerbado de hipóxia/reperfusão na placenta de mulheres com PE. Estas flutuações nas concentrações de oxigênio por sua vez assumem um papel desencadeante de estresse oxidativo placentário com consequente liberação de espécies reativas de oxigênio (Hung e Burton, 2006; Osol, Ko e Mandalà, 2017).

Os efeitos deletérios da hipoperfusão e isquemia placentária estão estreitamente associados às desordens gestacionais hipertensivas (Robertson et al., 1967; Brosen et al., 1972). À medida que a doença progride, no entanto, a função endotelial é comprometida, o que exacerba ainda mais a isquemia local (Benschop et al., 2018). Várias evidências apoiam a hipótese de hipóxia placentária na PE,

incluindo a incidência de RCF (Spinillo et a., 2019) e as alterações morfológicas da placenta (Falco et al., 2017). Estas modificações foram semelhantes às encontradas em explantes vilosos cultivados sob condições de hipóxia (Brodowski et al., 2017; Rao et al, 2018). A isquemia placentária também é responsável pela inflamação crônica materna, que contribui para grande parte da fisiopatologia da PE, tais como aumento da pressão arterial, disfunção endotelial, ativação de fatores anti-angiogênicos, ativação de células imunes e secreção de citocinas inflamatórias e, aumento de estresse oxidativo (Redman e Sargent, 2010).

Muitos desses processos são regulados pelo fator indutor de hipóxia (HIF-1) (Bunn e Poyton, 1996). Este fator está envolvido na transcrição de genes dependentes de oxigênio, que codificam proteínas associadas à angiogênese e ao metabolismo celular (Qingdong e Costa, 2006). No início da gestação, o aporte de oxigênio é baixo, o HIF-1α é expresso e ajuda no desenvolvimento da placenta (Rajakumar e Conrad, 2000). Nas placentas de mulheres com pré-eclâmpsia, a expressão da proteína HIF-1α é muito alta e, parece ter um papel fundamental na inibição da invasão trofoblástica (Caniggia et al; 2000; Rajakumar et al., 2004). Estudos em camundongos, mostraram que a expressão de Hif-1α em células trofoblásticas, além de seus níveis funcionais, como é observado na PE, resulta em desorganização placentária, inibição da diferenciação das células trofoblásticas, disfunção endotelial e falha na remodelação das artérias espiraladas maternas, alterações também mostraram presentes na PE (Albers et al., 2019).

Nesta cadeia de sinalização, a angiogênese (induzida por HIF-1α) depende da expressão de fatores de crescimento específicos como o endotelial vascular (VEGF) e seus receptores VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1), o fator transformante de crescimento beta-1 (TGF b-1), a angiopoietina (Ang-) 1 e 2, exercendo seus efeitos em grande parte por meio da síntese de óxido nítrico (Ayling et al., 2006; Harris et al, 2008). Evidencias também mostram que a disfunção vascular nas doenças da gravidez como a PE, se deve, principalmente, a alterações na estrutura dos vasos e ativação das vias de síntese de NO pelos agentes vasodilatadores (Singh et al., 2010; Osol, Ko e Mandalà, 2017).

O papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da pré-eclâmpsia, também é de grande importância. A exacerbação das flutuações nas concentrações de oxigênio na interface materno-fetal aumenta a atividade da xantina oxidase que passa produzir altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas moléculas altamente reativas causam danos generalizados e indiscriminados às células e tecidos, o que leva a uma resposta inflamatória intravascular e endotelial sistêmica materna (Possomato-Vieira e Khalil, 2016). Estas alterações são responsáveis pela disfunção endotelial seguida de hiper permeabilidade vascular, trombofilia e hipertensão, para compensar a diminuição do fluxo nas artérias uterinas devido a vasoconstrição periférica (Possomato-Vieira e Khalil, 2016).

A participação de uma resposta imunológica alterada também tem sido cogitada como fator fundamental no estabelecimento da PE. As células *Natural Killers* uterinas (u*NK*) são as células mais abundantes na interface materno-fetal, especialmente na decídua, durante o primeiro trimestre da gravidez. Estas células invadem as artérias espiraladas e participam da conversão em artérias de alta resistência que não são afetadas por fatores maternos de vasoconstrição. Inibição da atividade das células uNK tem sido associada à invasão trofoblástica deficiente e consequentemente em defeitos na remodelação das artérias espiraladas resultando em perfusão inadequada na interface materno-fetal e, desta forma, sendo considerado um fator predisponente para a PE e RCF (Zhang et al., 2016).

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC; do inglês: *major histocompatibility complex*) relacionado aos processos de tolerância materno-fetal também tem sido relacionado ao estabelecimento da PE (Djurisic e Hviid, 2014). O antígeno leucocitário humano (HLA)-G, considerado um gene de funções únicas de histocompatibilidade, é encontrado quase que exclusivamente em células trofoblásticas extravilosas na interface feto-materna. Este antígeno parece desempenhar funções relevantes na proteção do feto contra as células NK uterinas, se ligando aos receptores inibidores destas células e evitando sua ação citotóxica (Riteau et al., 1999). No entanto, estas células também expressam HLA-C que pode ser reconhecido por receptores do tipo KIR nas células T deciduais e NK uterinas (Parham, 2005; Hiby et al., 2004; 2010; Johnsen et al., 2018). Mães KIR AA com

fetos HLA-C2 são mais suscetíveis à pré-eclâmpsia, RCF e aborto recorrente (Hiby et al., 2004; 2010). Johnsen e colaboradores (2018) sugerem que as interações entre o HLA-C2 fetal e a ativação de KIRs em células NK ou células T maternas deciduais podem contribuir para a formação de aterose aguda, promovendo a inflamação vascular decidual local. O exato mecanismo pelo qual as células do citotrofoblasto deixam de remodelar os vasos arteriais uterinos, no entanto, ainda é um item sujeito a muitas especulações.

2.1.3.2 Segundo estágio: Desenvolvimento da síndrome materna

As características da PE grave não se limitam à placenta, mas também se estendem a efeitos generalizados na mãe que podem ser classificados como uma síndrome materna. Entre a placentação comprometida e a síndrome clínica da pré-eclâmpsia está a célula endotelial (Brosens et al., 2019). A agressão profunda a estas células é mediada por fatores circulantes, resultantes do desiquilíbrio na liberação de fatores solúveis pela placenta em condições isquêmicas (Hecht et al., 2016).

Hipóteses e modelos de investigação têm sido assunto de inúmeros estudos com a finalidade de elucidar os fatores e possíveis mecanismos que levam a essa disfunção endotelial (Tomimatsu et al., 2019).

Evidencias apontam para o comprometimento da invasão e da aquisição de um fenótipo vascular pelo citotrofoblasto extraviloso na PE grave como a consequência de uma concentração local insuficiente de fatores vasoativos como o VEGF e PlGF, expressos em altas concentrações durante a placentação normal pelo trofoblasto (Sharkey et al., 1993; Kaufmann, Black e Huppertz, 2003). Particularmente o PlGF é expresso e liberado ela placenta em quantidades elevadas na circulação materna. Este fator apresenta 53% de homologia com o VEGF, com quem compartilha muitas de suas ações biológicas (Park et al., 1994). Seus níveis proteicos aumentam a partir do segundo trimestre, atingindo um máximo na 29º semana; a partir da 32º semana, os níveis começam a decair (Cao et al., 1996; Autiero et al., 2003).

Acredita-se que ambos desempenhem um papel crítico no desenvolvimento da vascularização placentária normal ao se ligar aos seus receptores VEGFR-1 (FLT1) e VEGFR-2 (Young et al., 2010). Além destes, o fator transformante β de crescimento (TGF-β) também exerce papel de destaque nos processos angiogênicos em geral, em especial durante a gestação.

O VEGF e o PlGF exercem suas funções angiogênicas e angioativas através de seus receptores expressos na superfície das células endoteliais, como VEGFR2 e o FLT1 (do inglês: *fms-like tyrosine kinase-1*). O TGF-β regula a proliferação, migração e angiogênese das células endoteliais por meio de sua ligação com o co-receptor endoglina (ENG), expresso predominantemente em células endoteliais. Em condições normais, o sinciciotrofoblasto também produz os dois receptores solúveis FLT1 e Endoglina como uma forma de regular a atividade dos fatores angiogênicos (Levine et al., 2006). Entretanto, quando produzidos de forma desiquilibrada, a ligação dos receptores solúveis com o VEGF e o PlGF circulante, impede a ligação destes fatores aos seus receptores endoteliais e consequentemente bloqueiam a resposta angiogênica (fatores anti-angiogênicos) adequada à placentação, como observado na PE (Wang et al., 2009) (**Figura 2**). O desbalanço da secreção de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos pela placenta é, desta forma determinante no estabelecimento da PE grave.

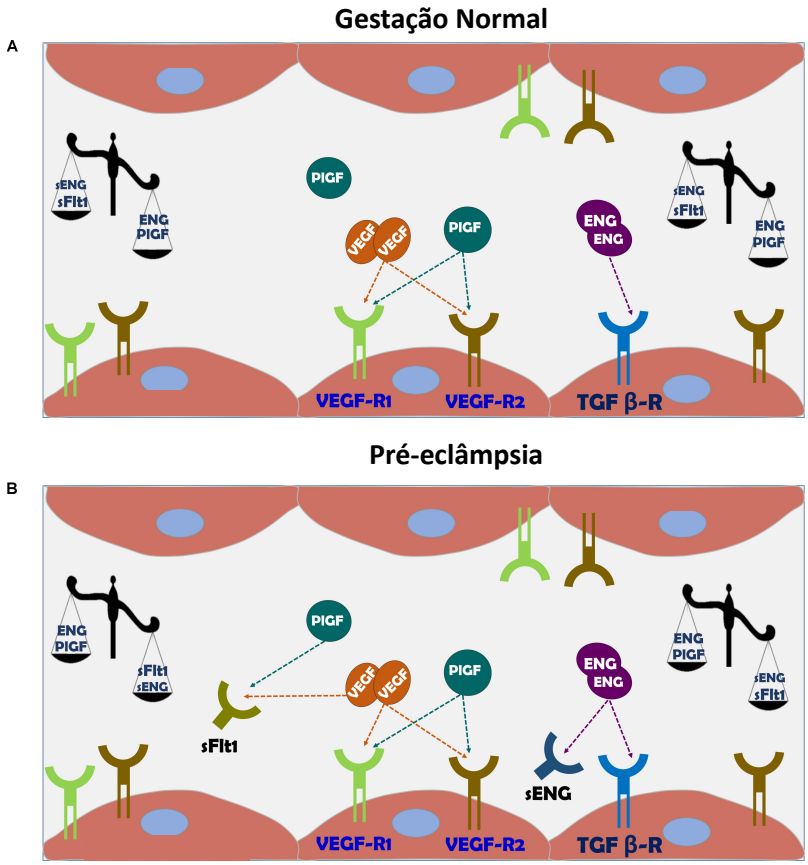


Figura 2 – **Fatores angiogênicos e anti-angiogênicos presentes na circulação materna na gestação saudável e na pré-eclâmpsia. A –** Em uma gestação normal, a placenta produz VEGF, PIGF e ENG (endoglina), que ao se ligarem aos seus respectivos receptores nas células endoteliais (VEGF-R1, VEGF-R2 e TGF-β-R) proporcionam uma angiogênese adequada para a gestação. **B –** Na PE, a isquemia placentária leva a um desbalanço liberação de fatores anti-angiogênicos (sFtl-1 e sEng), que se ligam VEGF, PLGF e ENG, impedindo sua interação com os receptores endoteliais maternos e impedindo a vasodilatação dos vasos arteriais (Adaptado de Armaly et al., 2018).

A identificação desses fatores placentários como biomarcadores de PE foi inicialmente relatada em 2003 (Maynard et al., 2003; Koga et. al., 2003; Tsatsaris et al., 2003). Em ratas prenhas, também se observou que a administração de sFlt-1 gerava sintomas semelhantes à pré-eclâmpsia tais como, hipertensão e proteinúria (Maynard et al. (2003). Também foi observado que o sFlt-1 e a sENG aumentam antes do início dos sintomas clínicos da PE e que estes níveis se correlacionam com a gravidade desta desordem (Levine et al., 2004, 2006). Também se observou

uma relação alterada na proporção sFlt-1/PlGF (Bdolah et al., 2014). Neste contexto, estes fatores e particularmente o sFlt-1 têm assumido um papel importante na patogênese da PE (Levine et al., 2006; Venkatesha et al., 2006; Romero et al., 2008; Tomimatsu et al., 2017).

O conjunto de sinais e sintomas que representam a clínica da PE não é o suficiente para um diagnóstico preciso. Desde 2010 tem-se associado a diminuição de PlGF e o aumento de sFlt-1 circulante, assim como o aumento na relação sFlt-1/PlGF nos três primeiros meses de gestação, como biomarcadores essenciais para melhoria e precisão do diagnótico antes de ocorrerem sintomas clínicos da PE (Monte, 2011; Mathur et al., 2016; Tomimatsu et al., 2019).

Rana et al. (2012) mostrou ainda que a relação sFlt-1/PlGF ≥ 85 pg/mL está associada ao estabelecimento da PE e a resultados adversos, e necessidade de interrupção da gestação em 2 semanas.

Atualmente, outros fatores tem sido considerados como as vesículas exocitadas na superfície celular, que são liberadas por todas as células e podem assumir diferentes dimensões e conteúdo (Familari et al., 2017). Vesículas extracelulares originadas a partir do sinciciotrofoblasto parecem desempenhar um papel importante na gestação normal e também nas desordens gestacionais (Baig et al., 2013; 2014). Nestes casos, considera-se que estas vesículas podem acentuar os processos inflamatórios e de coagulação observados na PE (Gilani et al., 2016 O'Brien et al., 2017).

A PE é denominada uma doença multissistêmica e ocorre um agravamento progressivo. Quanto mais tarde ocorrer o diagnóstico, maior as chances de a paciente desenvolver complicações que podem ser fatais. As pacientes apresentam vasoespasmos em diversos órgãos com elevação da resistência vascular periférica e da pressão arterial, o que leva à hipoperfusão tecidual generalizada. A lesão endotelial também promove trombose, consumo progressivo de plaquetas e alterações na permeabilidade vascular que levam a processos de coagulação disseminada e edema. Proteinúria e retenção de água e sódio refletem uma diminuição na taxa de filtração glomerular devido a hipoperfusão renal. Estas

alterações também podem afetar o cérebro, resultando em convulsão (eclâmpsia) ou acidentes vasculares (Possomato-Vieira e Khalil, 2016).

2.2 O estresse de Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela eucariótica envolvida no enovelamento e maturação de proteínas, síntese lipídica e homeostase do cálcio (Kim et al., 2008), bem como sensibilização, coordenação e mediação da resposta ao estresse (Kaufman et al., 2002; Zhang e Kaufman, 2008; Yang et al., 2014). Distúrbios em suas funções levam a um estado de estresse, que ativa vias de sinalização, em uma tentativa reparadora, tais como a resposta à proteínas mal-enoveladas (UPR, do inglês: *Unfolded Protein Response*).

O mecanismo da UPR é desencadeado quando agressões diversas que levam à redução da adenosina trifosfato (ATP), geram radicais livres ou quando o fornecimento de carboidratos para glicação é alterado, favorecendo o aparecimento de proteínas nascentes mal-enoveladas no RE. Este processo leva à redução da taxa de tradução, aumento da expressão de chaperonas e foldases, e ativação de um sistema de degradação associado ao RE (ERAD, do inglês: *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*), que juntos, minimizam os danos no enovelamento das proteínas (Xu, Bailly-Maitre e Reed, 2005; Scriven et al., 2009). Evidências mostram que a interrupção da homeostase protéica no RE resulta em respostas celulares desordenadas, contribuindo para a patogênese de várias doenças (Buhimschi et al., 2014; Khan, Yang e Wang, 2015; Cao, Luo e Shi, 2016; Yang et al., 2016).

A UPR tem como propósito inicial adaptar o RE às alterações ambientais e reestabelecer a função normal da célula. Se esta resposta adaptativa imediata falha, sinais de alarme desencadeados pelo RE ativam o NFκB (do inglês: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), que induz a expressão de genes mediadores da resposta de defesa (Tam et al., 2012).

O enovelamento normal das proteínas necessita que condições específicas sejam mantidas na célula e no lúmen do RE. Inicialmente, as proteínas recém-

formadas devem se ligar a uma proteína de choque térmico (HSP70; do inglês: *heat chock protein*) dependente de Ca^{2+}, no lúmen do ER, tais como BiP (do inglês: *Binding Protein*), também conhecida como 78-kDa *glucose-regulated protein* (GRP78) (Lievremont et al., 1997; Lee, 2005). Esta proteina também pode ser encontrada na superfície celular, onde atua como receptor e regula a proliferação e sobrevivência celular (Gonzalez-Gronow et al. 2009; Sato et al. 2010; Ni, Zhang e Lee, 2011; Gray e Vale, 2012). Para permitir a função normal das chaperonas, o lúmen do RE possui alta concentração de íons Ca^{2+} mantidos por transporte ativo através de Ca^{2+-}ATPases (Kim et al., 2008). Quando há distúbios nestas condições e ocorre um acúmulo de proteínas mal-enoveladas no lúmen, a resposta imediata é o recrutamento das chaperonas residentes na membrana do RE (Xu, Bailly-Maitre e Reed, 2005; Yoshida, 2007; Kim et al., 2008).

As UPRs abrangem três diferentes vias que estão sob controle de três proteínas transmembrânicas presente no RE: PERK (do inglês: *protein Kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), IRE-1 (do inglês*: inositol-requiring enzyme 1*) e ATF-6 (do inglês: *activating transcription factor 6*) (Kaufman et al., 2002; Yung et al. 2008; Burton et al. 2009; Wang et al. 2012; Yang et al. 2014) (**Figura 3**).

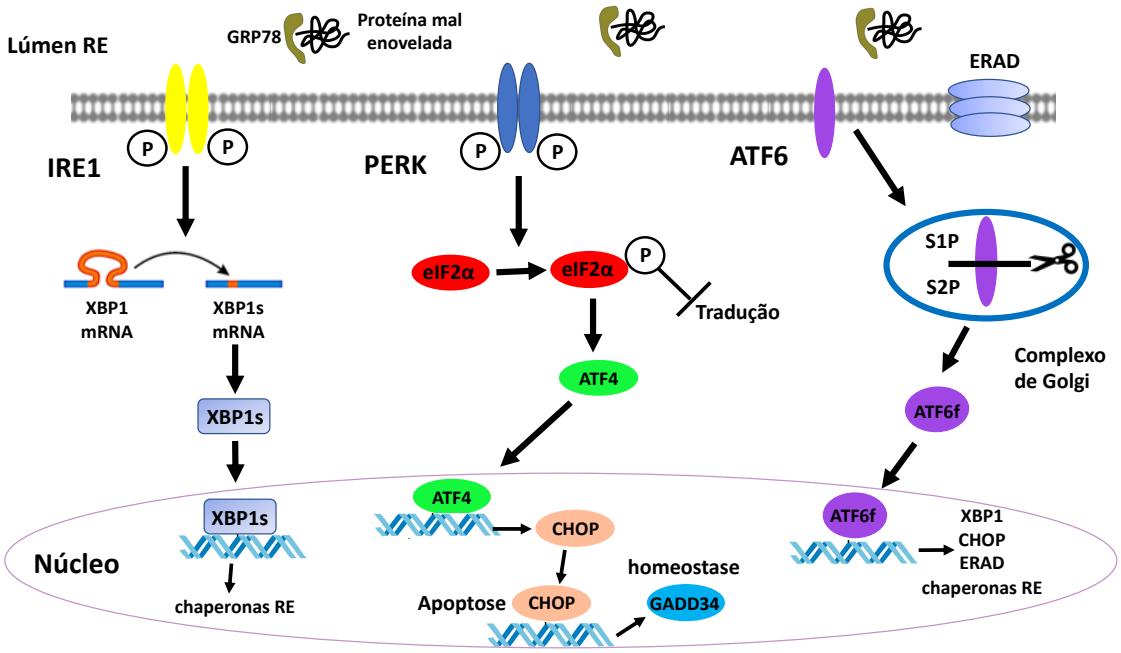


Figura 3 - Ativação da via de Estresse de RE. As três proteínas transmembranas (IRE1, PERK e ATF6) responsáveis pela ativação da via UPR estão representadas juntamente com seus intermediários.

Sob condições normais, estas três proteínas são inibidas pela ligação da proteína chaperona GRP78, porém a retirada desta chaperona por ligação competitiva com proteínas mal-enoveladas, provoca dimerização, autofosforilação e ativação de PERK e IRE1. A ausência de ligação de GRP78 com ATF6, por sua vez, induz sua translocação para o Golgi, onde é clivado, tornando-se um fator de transcrição ativo (Walter e Ron, 2011).

Conforme revisado por Burton e Yung (2011), PERK é uma proteína quinase Ser/Thr, que na ausência de GRP78, se dimeriza e sofre autofosforilação, ativando o domínio quinase. O principal alvo de p-PERK é o fator de iniciação da tradução eucariótico 2α (eIF2α), uma subunidade do complexo eIF2 que medeia a ligação entre o RNAt e a subunidade ribossomal. A fosforilação de eIF2α inibi sua atividade, portanto, rapidamente bloqueia a entrada de proteínas nascentes no lúmen do RE, reduzindo a produção proteica e o acúmulo de proteínas dentro do lúmen. Embora haja uma redução global na síntese de proteínas, algumas sequências de mRNA

com pequenos ORF (fase de leitura aberta; do inglês: *Open Read Frames*) na porção não transcrita 5' conseguem ser traduzidas como é o caso do ATF4 (do inglês: *Activating Transcription Factor 4*). Este fator de transcrição migra para o núcleo e induz a expressão principalmente de GADD34 (do inglês: *growth-arrest DNA damage gene 34*), CHOP (do inglês: *transcription factor C/EBP homologous protein*) e genes relacionados à autofagia (Senft e Ronai, 2015). CHOP é um fator de transcrição que controla genes codificados envolvidos na apoptose (Marciniak et al., 2004; Wortel et al., 2017; Zhang et al., 2016; HE et al., 2018). GADD34 provê um *feedback* sobre a inibição da síntese de proteínas por desfosforilação de p-eIF2α permitindo que a tradução seja retomada se a homeostase do RE for restaurada.

ATF6 é um fator de transcrição que é inicialmente sintetizado como uma proteína transmembrana. Após a liberação da GRP78, esta proteína é transportada por vesículas para fora do RE em direção ao aparelho de Golgi, onde proteases residentes, S1P e S2P (do inglês: *site-1 and site-2 protease*) a clivam. Esta clivagem leva à formação de uma forma ativa, que migrando para o núcleo ativa os genes alvos da UPR. Deste modo, a síntese de proteínas chaperonas do ER se eleva sob estímulos leves, ou induz a apoptose em casos mais graves (Schindler e Schekman, 2009). Dentre os alvos da ATF6, destacam-se as proteínas do RE envolvidas no enovelamento de proteínas como GRP78, proteína dissulfeto isomerase e uma chaperona da família HSP90, a GRP94 (do inglês: *glucose-regulated protein 94*) (Walter e Ron, 2011).

Após a liberação da GRP78, também ocorre dimerização da IRE1 e em resposta a UPR, há ativação de seu domínio quinase citoplasmático (Ser/Thr) que é necessário para a ativação do domínio endorribonuclease. Esta ativação clivagem o mRNA do fator de transcrição *x-box binding protein 1* (*XBP-1*) que ao ser traduzido torna-se competente para se ligar aos genes envolvidos na função do RE (Yoshida et al., 2001; Harding et al., 2003). Dentre as atividades desencadeadas, destaca-se a regulação da biossíntese lipídica para a formação de cisternas no RE, a expressão de genes envolvidos no enovelamento das proteínas e de enzimas da via ERAD, que promovem a degradação das proteínas mal enoveladas (Burton e Yung, 2011).

Se a UPR não conseguir controlar o acúmulo de proteínas mal enoveladas, uma via de sinalização para a morte celular é ativada, por meio da clivagem de caspase 4, localizada na membrana do RE (Hitomi et al., 2004). Esta caspase ativa a caspase 9 diretamente (Rao et al., 2002). Além disso, *CHOP* induzida por PERK e ATF6 pode sensibilizar as células para a apoptose, com a supressão da expressão gênica do *Bcl-2* (do inglês: *B cell CLL/lymphoma-2*) e a regulação positiva de *Bim*, um pró-apoptótico BH3 membro da família Bcl-2 (Mccullough et al., 2001; Puthalakath et al., 2007). A ativação de caspase 12 também está associada à ativação de IRE1, porém, sua contribuição para apoptose ainda é controversa (Song et al., 2008; García de la Cadena e Massieu, 2016).

Os genes *SDF2* (do inglês: *Stromal Derived Factor 2)* e *SDF2L1* (do inglês: *Stromal Cell Derived Factor 2-like1*) também têm sido relacionados com a ativação das vias da UPR. Em humanos e camundongos, o *Sdf2* e o *Sdf2L1* são genes parálogos, cuja sequência proteica apresenta 78% de similaridade e 68% de igualdade. Fukuda et al. (2001) mostraram que o *SDF2L1* é um gene indutor de estresse de RE e pertence a família das proteínas O-manosiltransferase. Estudos prévios em camundongos mostraram a localização dessa proteina no RE e uma alta similaridade estrutural com Sdf2l1 e SDF2-like, ambas envolvidas na via de estresse de RE, sugerindo que tambem participa desta via (Lorenzon-Ojea et al., 2014). Evidencias também mostraram uma relação entre a expressão de SDF2 e a via PERK, quando mecanismos de morte são ativados (Lorenzon-Ojea et al., 2016). Estes achados sugerem que SDF2 pode ter um papel crucial no destino das células em que a via UPR foi ativada. A presença de níveis baixos de SDF2 em tumores com baixas expectativas de remissão, particularmente em casos em que o sistema de autoproteção celular por morte foi aliviado de alguma forma, corrobora essa possibilidade e tem sugerido a avaliação de SDF2 como uma dado clínico de relevância (Kang et al., 2009).

As vias da UPR são agora reconhecidas como tendo um papel central na fisiopatologia de doenças crônicas renais (Gallazzini e Pallet, 2018), neurodegenerativas (Xiang et al., 2017), diabetes (Yalcin e Hotamisligil, 2013), oculares (Gorbatyuk, Starr e Gorbatyuk, 2020), aterosclerose e doenças cardíacas

(Lee, Lee e Jeon, 2020). Na medida em que o estresse de RE prolongado e a ativação da UPR podem levar à apoptose e autofagia, é um fator que também deve ser estudado com profundidade nas desordens gestacionais.

2.2.1 Mecanismos de sobrevivência, a placenta e o estresse de RE

Os mecanismos de controle de estresse são críticos para minimizar ou superar os danos causados pelas condições ambientais que sofrem mudanças constantes. A ativação da UPR é delineada para promover a recuperação da homeostase do ER (Xu, Bailly-Maitre e Reed, 2005). Neste sentido, a UPR desempenha um papel essencial no desenvolvimento e funções da placenta (Yung et al. 2008; Wang et al. 2012; Fu et al. 2015; Bastida-Ruiz et al., 2017).

Conforme revisado por Burton e Yung (2011), o sinciciotrofoblasto sintetiza um grande número de hormônios peptídeos e fatores de crescimento, incluindo o hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio lactogênico placentário (hPL), PlGF, VEGF e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). A produção destes hormônios, entretanto, torna-se vulnerável se a função normal do RE é alterada. Neste contexto, a sinalização materno-fetal e a capacidade da placenta de influenciar o metabolismo materno pode ser prejudicada, restringindo as funções trofoblásticas. Nesse sentido qualquer interferência na síntese de moléculas reguladoras placentárias pode atingir proporções deletérias à gestação.

Estudos anteriores observaram que IRE1α desempenha ações que favorecem o desenvolvimento placentário. Em camundongos, a inativação de IRE-1α resulta na morte embrionária após 12,5 dias de gestação associada a uma redução na expressão de VEGF-A (Iwawaki et al., 2009). VEGF-A é um indutor de angiogênese da família do VEGF. IRE1α regula a expressão de VEGF-A pelas células trofoblásticas do labirinto placentário, desempenhando um papel relevante no desenvolvimento da barreira placentária, o local de trocas moleculares entre a mãe e o feto. Sem a ativação correta da UPR, os níveis de IRE1α e VEGF-A não são suficientes para a formação adequada dos vasos sanguíneos, levando a um desenvolvimento placentário incorreto e prejudicando as trocas materno-fetais

(Ghosh et al., 2010). Estes achados estabelecem claramente a importância da UPR para a placentação normal.

Embora o estresse de RE tenha papel importante durante os estágios do desenvolvimento inicial da placenta, sua ativação exacerbada também pode resultar em distúrbios da gravidez. Estudos recentes demostram que nestas condições o estresse de RE pode contribuir para perdas gestacionais (Liu et al., 2011) e outras patologias envolvendo a placenta como a pré-eclampsia grave (Burton e Yung, 2011; Fu et al., 2015), RCF (Hung et al., 2017) e diabetes gestacional (Yung et al., 2016). Estudos experimentais e clínicos apoiam a hipótese de que o estresse de RE pode causar anormalidades funcionais que afetam o desenvolvimento da placenta, tais como redução na proliferação celular e redução do volume viloso placentário, o que está associado a desfechos negativos que envolvem a RCF e baixo peso ao nascer (Yung et al., 2008; 2012; Kawakami et al., 2013).

2.2.2 O estresse de RE e a PE

Os primeiros estudos associando estresse de RE em desordens gestacionais, mostraram dilatações das cisternas do RE no sinciciotrofoblasto em casos de PE (Jones e Fox, 1980) e em amostras de placenta com anóxia (Kaufmann, 1985), indicando a perda da homeostase reticular.

Yung et al. (2008), revelou a primeira evidência molecular da ativação da UPR em placentas com RCF e RCF associada a PE. Em ambos os grupos, foi observada a fosforilação de eIF2α, o que não ocorreu nas placentas controle. A fosforilação de eIF2α foi maior no grupo RCF e PE, além do aumento de CHOP e GRP94, sugerindo um alto nível de estimulação do RE. O aumento da fosforilação de eIF2α nestas placentas levou a uma redução dos componentes da via AKT/mTOR (do inglês: *mammalian target of rapamicin*), sugerindo que houve uma inibição da tradução. A sinalização de AKT desempenha um papel central na regulação da proliferação celular e esta perda de atividade pode ter um efeito prejudicial severo sobre o desenvolvimento da placenta.

Outro resultado obtido por Yung et al. (2008), foi a redução de 75% e 85% nos níveis da proteína ciclina D1, respectivamente em placentas associadas à RCF e RCF com PE. A proteína ciclina D1, é uma proteína regulatória do ciclo celular e, sua redução pode resultar em uma desacleração do processo de proliferação celular, no caso, induzido pela isquemia-reperfusão. Neste contexto, a fosfofrilação de eIF2α associado a inibição da síntese proteica, parece serem os farores responsáveis pela diminuição nos níveis destas proteínas e o comprometimento da proliferação celular.

Recentemente, Yung et al. (2014) também mostraram que há uma diferença na ativação das vias de sinalização UPR placentária associada a uma redução na sinalização da via AKT entre pacientes com PE precoce e tardia. Esses achados apoiam o conceito de que os casos de PE de início precoce são predominantes devidos à patologia placentária.

Lian et al. (2011), também observaram aumento do estresse de RE na decídua de gestantes com estas patologias, com a mesma gradação em relação às gestantes com PE+RCF em relação a eIF2α e ATF6. A imunoreatividade de ATF6 e XBP1 esteva presente em mais do que 80% do citotrofoblasto extraviloso, células deciduais e macrófagos. Os autores concluiram que estas alterações associadas à diminuição da proliferação celular prejudicam o desenvolvimento placentário observado na RCF e PE. Por outro lado, a presença de níveis elevados da proteína XBP1 na PE em relação à PE+RCF, parecem indicar que esta proteína age como um regulador negativo de estresse de RE, agindo como um mecanismo protetor contra os efeitos prejudiciais da ativação exacerbada dessa via.

Um resultado conflitante foi mostrado por Fu et al. (2015) ao avaliar a expressão de marcadores de apoptose induzida por estresse de RE em placentas de mulheres com PE grave de início precoce e tardio. Seus resultados mostraram aumento na expressão GRP78, PERK, eIF2α, ATF4, CHOP e caspase 12 nas placentas PE comparadas com as de gestantes saudáveis e maior expressão de GRP78, PERK e ATF4 nas placentas PE de início precoce comparadas com as placentas PE de início tardio. No entanto, não obtiveram diferenças significativas na expressão de ATF6 e IRE1 entre os grupos estudados.

O estresse de RE pode ser induzido por muitos estímulos e o mecanismo pelo qual ocorre sua manifestação na PE ainda não é totalmente conhecido. Os processos de isquemia seguida de reperfusão parece ser um fator desencadeante importante, o que acontece na PE precoce e grave devido à não remodelação das artérias espiraladas na região miometrial (Brosens, Dixon e Robertson, 1977; Gerretsen et al., 1981; Khong et al., 1986; Meekins et al., 1994; Lyall, 2002). A porção da artéria logo abaixo do limite do endométrio/miométrio representa um segmento altamente especializado contrátil (Brosens, Pijnenborg e Brosens, 2002), que previne a perda de sangue excessiva no período menstrual. A manutenção deste segmento com essa força contrátil nos casos de PE predisporia à vasoconstrição espontânea, e, portanto, a uma lesão do tipo isquemia-reperfusão (Burton et al., 2009; 2011).

Frequentes episódios de isquemia estão associados à restrição das concentrações intracelulares de glicose, o que pode restringir a glicosilação normal dentro do RE, ativando a UPR. Alternativamente, a isquemia reduz os níveis intracelulares de ATP, o que também compromete o funcionamento das proteínas chaperonas GRPs, e possivelmente as bombas iónicas Ca^{2+}-ATPase da membrana do RE. A isquemia também pode ter um efeito mais direto sobre a liberação de cálcio no RE (Hool e Corry, 2007; Haché et al., 2011). O desequilíbrio de cálcio pode ainda prejudicar a ligação de GRP78 às proteínas mal enoveladas e, desta forma, compromete o mecanismo de enovelamento de proteínas e a ativação das vias de sinalização cálcio dependentes no citosol. Além disso, se o estresse no RE é muito intenso, com grande alteração da permeabilidade ao Ca^{2+}, o acúmulo deste no citosol altera a permeabilidade transicional de mitocôndrias, levando à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), redução rápida na síntese de ATP, ativação de fosfolipases e morte celular por necrose (Xu, Bailly-Maitre e Reed, 2005).

Um estudo recente também mostrou um aumento significativo na expressão de HIF-1α e CHOP em placentas PE comparadas com placentas normais (Verma et al., 2018). Estes resultados foram correlacionados à hipóxia e à potencialização da liberação de microvesículas na circulação materna, o que também em sido clamado como um fator importante na patogênese da PE.

A liberação de debris apoptóticos pelo sinciciotrofoblasto é um dos muitos fatores implicados atualmente na segunda fase da PE (Redman e Sargent, 2000). Estudos in vitro mostraram que partículas celulares placentárias são altamente irritantes para as células endoteliais, levando à ativação e resposta inflamatória (Smarason et al., 1993). O aumento da liberação de fatores pelos debris apoptóticos do sinciciotrofoblasto está relacionado ao aumento de morte celular, principalmente, na PE grave (isso não ocorre em casos de RCF) (Allaire et al., 2000; Goswami et al., 2006). O estresse de RE fornece pelo menos duas possíveis vias para mediar este efeito, a ativação de CHOP e de caspase 4. Como dito anteriormente, CHOP é um fator de transcrição que inibe a expressão de BCL-2, e portanto, atua como fator pró-apoptótico (Li et al., 2006).

Outros fatores envolvidos nas funções do retículo endoplasmático também têm se mostrado alteradas nas placentas de gestantes com PE.

A placenta de gestantes com PE grave também apresenta níveis aumentados de SDF2 concomitante ao aumento de GRP78 e p-eIF2α em relação à placenta de gestantes saudáveis. A relação de SDF2 com a expressão de CHOP e redução na atividade de caspase-3 (Lorenzon-Ojea et al., 2016), sugere que este fator via UPR pode estar controlando o balanço entre sobrevivência e morte das células de placentas com PE (Lozenzon-Ojea et al., 2016).

Um estudo conduzido por Shi et al. (2012) identificou aumento nos níveis de calreticulina (CALR) em placentas de gestantes com PE. Ainda mostraram que em células JEG-3 transfectadas com um vetor que expressa CALR apresentam inibição de atividade invasiva acompanhada de aumento de apoptose. A CALR é uma importante proteína residente do RE, que participa da regulação da homeostase intracelular de Ca^{2+}, adesão celular e apoptose celular. Estes resultados sugerem que o aumento da CALR na placenta pode induzir apoptose e prejudicar a invasão das células citotrofoblásticas extravilosas, levando a uma placentação superficial, como observado na PE.

Estudo semelhante avaliou a expressão de outra proteína reguladora da homeostase do cálcio, a endotelina 1 (ET-1). Jain et al. (2012) mostraram aumento nos níveis de ET-1 em placentas de pacientes com PE comparadas com pacientes

normotensas. Além disso, as células trofoblásticas JEG-3 e BeWo tratadas com ET-1 mostraram um aumento na expressão dos marcadores de estresse de RE via fosfolipase C inositol trifosfato (PLC-IP3; do inglês: *phospholipase C inositol triphosphate*).

Du et al. (2017), avaliaram a expressão do estresse de RE e das enzimas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) em placentas de mulheres com PE. A isoforma eNOS é expressa constitutivamente no endotélio vascular e mantém o tônus vascular através da síntese intrínseca do NO, inibindo a adesão de leucócitos e plaquetas ao endotélio e impedindo o estado pró-inflamatório. A isoforma iNOS é estimulada em uma condição inflamatória e produz um aumento temporário de NO. Os resultados deste estudo mostraram um aumento na expressão de GRP78, GRP94, p-PERK, eIF2a, p-eIF2a, XBP1, CHOP, IRE1, p-Ire1 e iNOS no grupo PE e a redução da expressão eNOS. A regulação positiva de CHOP e iNOS foi consistente com apoptose observada nas placentas PE. Esses dados sugerem que a resposta exagerada ao estresse de RE e o aumento de iNOS podem estar associados ao aumento de apoptose nas placentas PE, e que também o iNOS pode contribuir para a fisiopatologia da PE.

Embora com muitos detalhes ainda por ser elucidados, evidências em outros modelos celulares apontam para uma relação entre o estresse oxidativo (como o observado nas placentas de mulheres com PE) e o estresse de RE e suas vias associadas de resposta. Xue e colaboradores (2005) mostraram que citocinas inflamatórias como o TNFα ativam a via UPR em uma relação dependente da produção de ROS. O aumento de TNF-α na circulação materna na PE (Wang e Walsh, 1996), poderia, desta forma, ser mais um fator fundamental na patogenia desta desordem, desencadeando o estresse oxidativo e este por sua vez at[illegible] a via UPR.

3 JUSTIFICATIVA

A literatura abordando a PE é por demais vasta. Apesar dos inúmeros fatores que concorrem para sua instalação e agravamento, muito de sua etiologia continua a ser um grande enigma, assim como as formas como a doença se manifesta, geralmente como precoce e grave ou em formas mais brandas e tardias, dentre outras variações. A maciça força investigativa clínica e molecular desta patologia permitiu definir padrões de risco, tratamentos, vias moleculares e celulares envolvidas, mas ainda assim, deixando muitos hiatos a serem preenchidos.

Neste contexto, nosso interesse foi investigar a influência dos fatores solúveis que se acumulam na circulação materna sobre a placenta, o que poderia (ou não) contribuir como um fator de retroalimentação desta desordem e/ou seu agravamento. Especificamente, investigamos a influência do soro materno de gestantes com pré-eclâmpsia grave sobre vilos placentários e células de linhagem trofoblástica, por meio da ativação da via de estresse de RE. Nossa hipótese é que o desequilíbrio ambiental pré-eclâmptico caracterizado por moléculas solúveis no soro materno, causem um insulto e exacerbem uma resposta a proteínas mal enoveladas (estresse de RE), fazendo com que a resposta ao insulto patológico seja ao mesmo tempo indutor e agravante da PE. Ressalta-se ainda que as alterações induzidas pela ativação dessa via incluem a inibição da síntese proteica, diminuição da proliferação celular, ativação de respostas pró-inflamatórias e morte celular com prejuízo das funções orgânicas e teciduais, o que é observado na placenta da PE e de outras patologias gestacionais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do soro de gestantes com PE sobre a via de estresse de retículo endoplasmático em vilos coriônicos e em células trofoblásticas.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do soro de gestantes com PE sobre explantes coriônicos de placentas humanas saudáveis a termo e sobre as células da linhagem trofoblástica HTR-8/Sv-neo, sob condições de normóxia.

O possível efeito deste soro foi avaliado através das seguintes abordagens:

1. Determinar a atividade metabólica e citotóxica dos explantes vilosos e das células trofoblásticas tratadas com soro de gestantes saudáveis e com PE.
2. Análise da expressão gênica de *sXBP1*, *CHOP*, *GADD34* e *SDF2* e análise da expressão proteica de BiP/GRP78, eIF2α, peIF2α, SDF2 e ATF4.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O grupo amostral foi constituído por 14 gestantes a partir de mulheres com acompanhamento pré-natal no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), Departamento de Obstetrícia e Ginecologia. Foi obtido o consentimento prévio de cada gestante. O projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética do HC-FMUSP e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP). Os critérios de inclusão das gestantes em cada grupo foram determinados a partir das seguintes condições:

Gestantes pré-eclâmpticas: 7 gestantes com diagnóstico clínico de PE determinado pela manifestação de hipertensão arterial (≥160/90 mm Hg) e proteinúria (≥300 mg/24 h) com idade gestacional entre 24 e 35 semanas.

Gestantes saudáveis: 7 gestantes de idade gestacional entre 38 e 40 semanas, com pressão sanguínea ≤ 140/90 mm Hg, sem preoteinúria.

Os certérios de exclusão para ambos os grupos foram: doenças crônicas diagnosticadas (que poderiam predispor a gestante à PE - hipertensão, doença renal, obesidade, diabetes), não fumantes, sem uso de álcool ou medicamentos de uso contínuo, com reações sorológicas negativas para HIV e sífilis e sem infecções diagnosticadas e parto normal, devido a liberação de hormônios e citocinas que poderiam interferir nos resultados deste estudo.

5.1 Procedência dos reagentes

Ambion - Ambion®, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA

Applied Biosystems – Applied Biosystems®, Life Technoloiges, Carlsbad, CA, EUA

BD Diagnostics – BD Diagnostics, Nova Jersey, EUA

Bio-Rad – Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Cell Signaling – Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, EUA

Cobas e601 – Roche Diagnostics, Alemanha

Corning – Corning Inc., NY, EUA

Elecsys® sFlt-1/PlGF – Roche Diagnostics, Alemanha

Eppendorf – Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha

Gibco – Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

GraphPad – GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA

Invitrogen – InvitrogenTM, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA

KPL – KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Washington DC, USA Millipore – Merck Millipore, Billerica, MA, EUA

Molecular Devices – Molecular Devices LLC, CA, EUA

NanoDrop – NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware

NIH – NIH, Bethesda, EUA

Pierce – Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Precellys® – Bertin Corp., Rockville, EUA

Roche – Roche Diagnostics, Alemanha

Santa Cruz – Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EUA

Sigma – Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA

Syngene – Syngene, Frederick, MD, EUA

Thermo – Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA

5.2 Amostras de sangue

As amostras sangue das gestantes saudáveis e com PE foram obtidas no previamente ao momento do parto. As amostras de sangue (10 mL de sangue venoso) foram coletadas em tubos contendo gel separador BD *Vacutainer® Venous Blood Collection* (BD Diagnostics).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 4°C, 2000 RPM por 30 minutos para obtenção do soro. Após, este foi mantido em alíquotas, a - 80º C. No momento do uso, as amostras foram aquecidas em banho-Maria a 56°C por 20 minutos com a finalidade de inativar os componentes termolábeis presentes no soro. Todas as placentas foram obtidas de cesáreas eletivas com indicação de laqueadura (saudáveis) ou no caso das gestantes com PE, em cesáreas de emergência devido a complicações severas.

5.3 Produção de fatores vasoativos

As concentrações de PlGF e sFlt-1 presentes no soro das gestantes saudáveis e com PE (n = 4, cada) foram medidas por um imunoensaio de eletroquimoluminiscência (Elecsys® sFlt-1/PlGF) no imuno-analisador automático Cobas e601 (Roche), mostrando um tempo de resposta de 18 min. Os intervalos de medição foram de 3 a 10.000 pg / mL para PlGF e 10 a 85.000 pg / mL para sFlt-1, e os limites de quantificação foram 10 pg / mL e 15 pg / mL, respectivamente. O coeficiente de variação entre ensaios do PlGF foi de 4,1% a uma concentração média de 96 pg / mL do *PreciControl Multimarker 1* (Roche) e 3,6% a 973 pg / mL do *PreciControl Multimarker 2* (Roche). Uma imprecisão semelhante entre ensaios foi estimada para sFlt-1, 4,3% a 98 pg / mL do *PreciControl Multimarker* 1 e 3,8% a 1020 pg / mL do *PreciControl Multimarker* 2.

5.4 Análise do efeito do soro de gestante PE sobre os explantes coriônicos

5.4.1 Cultivo e tratamento dos explantes placentários

Cotilédones placentários (n=3) das gestantes saudáveis e com PE foram coletados imediatamente após a cesárea em tampão fosfato-salina (PBS 0,1 M pH 7,4) e suplementado com 1 % estreptomicina/penicilina, 0,5% gentamicina, 0,25 % anfoterecina B e 25 mM glicose (PBS suplementado). No laboratório, os fragmentos foram lavados em PBS (Sigma) estéril a fim de remover o sangue.

Os vilos coriônicos terminais foram então dissociados, lavados em PBS estéril suplementado e imediatamente cultivados de acordo com Aplin et al. (1991). Brevemente, a decídua foi removida de cada cotilédone de modo a expor as vilosidades coriônicas terminais. Estas estruturas foram dissecadas com um auxílio de um estéreo microscópio, utilizando-se bisturís. Os vilos terminais dissecados foram lavados com meio Hanks (Sigma) suplementado com 1 µL/mL penicilina, 1 µL/mL estreptomicina 100.000UI, 1 µL/mL gentamicina 10.000 UI e, em seguida com meio DMEM-F12 (Sigma). Os vilos dissecados foram colocados em placas de 48 poços (Corning) em meio DMEM-F12 suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Gibco) e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 5 µg/mL de gentamicina e 2,5 mg/mL de anfoterecina B) e mantidos em incubadora a 37ºC, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2, por 24 horas.

A quantidade de vilos (explantes) plaqueados foi determinado a partir da quantificação proteica e avaliação de suas atividades metabólicas. Os explantes foram pesados em lotes de 5 mg a 50 mg, tiveram seus conteúdos proteicos avaliados colorimetricamente utilizando o utilizando o kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce) conforme instruções do fabricante e sua atividade metabólica e viabilidade avaliados respectivamente pelo ensaio de MTT e LDH (a seguir descritos). Estes testes determinaram que vilos de 30 mg apresentavam melhor viabilidade e atividade metabólica e maior quantidade de proteína.

Desta forma, todos os experimentos se seguiram em vilos isolados perfazendo 30 mg de peso. Os explantes foram plaqueados em placas de cultura recobertas com fibronectina (10 µg/mL em PBS). Para permitir a estabilização das culturas, os explantes foram inicialmente incubados por 12 h, a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO_2. Após este período, o meio foi substituído por meio DMEM-F12 contendo 10% do soro materno saudável (SS) ou de gestante com PE (SPE), aonde permaneceram por adicionais 24 horas, nas mesmas condições de cultivo acima descritas. Após este período, os explantes foram então coletados e armazenados para análises posteriores por *Western Blotting* e *RT-qPCR*.

Este estudo inclui os seguintes grupos experimentais: **SS (controle)** – amostras de placenta de gestações saudáveis tratadas com soro de paciente

saudável; **SPE** – amostras de placenta de gestações saudáveis tratadas com soro de paciente com PE.

5.4.2 Ensaio atividade metabólica por MTT

O ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) mede a atividade da desidrogenase mitocondrial. O MTT entra na célula e é reduzido e convertido em formazan, de cor púrpura, apenas em células vivas com metabolismo ativo. Este método foi utilizado para avaliar a atividade metabólica dos explantes coriônicos tratados com soro de gestante saudável ou PE (n = 7, cada). O ensaio se seguiu adicionando aos explantes coriônicos, após cultivo, 100 µL/poço da solução de MTT (Thermo) na concentração final de 0,5 mg/mL preparada em meio DMEM-F12 sem fenol e mantidas em estufa, à 37ºC com 5% de CO_2 por 90 minutos. Após a retirada desta solução, foi adicionado 100 µL de DMSO (Sigma) para solubilização dos cristais de formazan. O sobrenadante foi coletado e em seguida realizada a leitura no espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 Absorbance Microplate Reader (Molecular Devices) em comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram realizados em triplicata e expressos em absorbância conforme a fórmula abaixo:

$$Atividade\ metabólica\ = Absorbância\ vilos - Absorbância\ do\ meio\ de\ cultivo\ *$$

* Meio de cultura, mantido em mesmas condições de cultivo, porém sem vilos.

5.4.3 Ensaio atividade citotóxica por LDH

O ensaio do LDH baseia-se na liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) a partir de células com membranas celulares danificadas. A LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. As taxas de morte celular em função dos tratamentos dos explantes placentários com soro de gestantes saudáveis e PE foram calculadas a partir de ensaios para a mensuração

de LDH (lactato desidrogenase), extravasado para o meio extracelular após a lise das células. O ensaio de LDH é baseado na conversão de lactato em piruvato na presença de LDH com redução paralela de NAD em NADH. Estes ensaios foram realizados utilizando-se o kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay (Pierce) conforme as indicações do fabricante. O explantes coriônicos foram plaqueadas em triplicata e tratados por 24 horas com o soro de gestantes saudáveis ou PE (n = 7). Os meios experimentais e controles foram então coletados e transferidos para placas de fundo plano de 96 poços.

Também foram preparados os seguintes experimentos controle em triplicata: poços contendo meio de cultivo completo (com SBF) que não receberam explantes (avaliação de LDH sérico), poços contendo meio completo sem soro (controle de interferência do SBF) e sem explantes (branco) e poços em que os explantes foram previamente tratados com água ultra-pura estéril (50 µL, 45 min., 37ºC, controle de atividade espontânea). Como controle positivo, poços com explantes foram tratados com tampão de lise (*Positive Control* em meio DMEM F12 sem SBF, 50 µL, 1/10 vol). As amostras então receberam 100 µL de *Reaction Mixture* por 10 min, a 37ºC, após o que foi adicionado 50 µL de *Stop Solution* para que a reação fosse interrompida. A leitura foi realizada no espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 Absorbance Microplate Reader (Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 490 nm e 690 nm. A seguinte fórmula foi usada para o cálculo da porcentagem de citotoxicidade celular:

$$\%\ Citotoxicidade = \frac{(Controle\ A - Amostra\ experimental)}{Atividade\ total\ de\ LDH}\ x\ 100$$

Aonde:

Controle A = controle espontâneo de liberação de LDH (água)

Atividade total de LDH = Atividade máxima de liberação de LDH – controle da liberação espontânea

5.4.4 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (*q*-PCR)

5.4.4.1 Extração de RNA dos explantes coriônicos

Os explantes coriônicos de placentas saudáveis tratados com soro materno saudável ou PE por 24 horas (n = 7) foram armazenados em microtubos de 1,5 µL previamente tratados e autoclavados, livres de RNAses e DNAses, contendo 200 µL de solução estabilizadora RNA*later*® (Invitrogen), em freezer -80°C. No momento do preparo das amostras para a extração de RNA, o RNA*later*® foi retirado, e as amostras lavadas com solução PBS, 0,1M. Em seguida, as amostras foram transferidas para microtubos contendo *beads* e 300 µL de TRIzol® (Ambion). Estas amostras foram lisadas no homogenizador de tecidos Precellys® (Bertin Corp.).

As amostras foram então precipitadas com 200 µL de clorofórmio e centrifugadas a 12.000 g, por 15 min, a 4°C para a separação do RNA total, proteínas e DNA. A fase contendo RNA total foi removida e acondicionada em microtubos previamente tratados e autoclavados. Na sequencia, as amostras foram resuspendidas (com o dobro do volume do RNA total) com álcool etílico 70%. Procedeu-se a extração utilizando o PureLinkTM RNA Mini Kit (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante.

A concentração de pureza do RNA total foi calculada pelo espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop) nas absorbâncias de 230, 260 e 280 nm e por meio da relação A260/A280, respectivamente.

5.4.4.2 Remoção do DNA genômico

A remoção do DNA genômico das amostras de RNA dos explantes coriônicos de placentas saudáveis tratadas com soro materno saudável ou PE por 24 horas foi realizada conforme o seguinte protocolo: 1 µg do RNA total extraído foi incubado por 15 min em temperatura ambiente na solução contendo 10% desoxiribonuclease I purificada DNAse I (Invitrogen) e 10% solução tampão DNAse 10x em água DEPC.

O bloqueio da reação foi realizado com 10 % de 25 mM EDTA, 10 min, a 65°C em termociclador Thermal Cycler (Eppendorf).

5.4.4.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 1µg de RNA total tratado com DNase I foi transferido para um microtubo e o volume ajustado para 9,5 µL com H2O tratada com DEPC. Adicionamos 2 µL do Tampão de Reação (10X) da Transcriptase Reversa, 0,8 µL do mix de dNTPs (25X), 2 µL de random primer (10X) e 0,5 µL da enzima High Capacity, num volume final de 20µL. A reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas, após isso a enzima foi inativada a 85°C por 5 minutos.

5.4.4.4 *Real Time q*PCR

As amostras foram preparadas para análise da expressão dos seguintes genes *SDF2*, *sXBP1*, *CHOP*, *GADD34, ATF4* e *YWHAZ* utilizando-se Power UP SYBR Green PCR Master Mix™ (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Para este experimento foi utilizado 6,88 µL Power UP SYBR Green PCR Master Mix (2x), 5,22 µL de H_2O DEPC, 0,55 µL do primer sense, 0,5 do primer antisense e 0,7 µL do cDNA. A amplificação por reações de PCR foi realizada em triplicata usando o sistema de PCR em tempo real Step One Plus™ (Applied Biosystems). As amostras foram amplificadas com uma desnaturação inicial de 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto e 95°C por 30 segundos. A eletroforese em gel de agarose de produtos amplificados foi realizada para verificar o tamanho dos produtos amplificados (dados não mostrados). O gene da *YWHAZ* foi utilizado como normalizador para cada RNAm analisado. Para toda as reações foi utilizado controle negativo. Além disso, em todos os ensaios foi utilizada uma amostra controle na qual não havia cDNA.

Para a avaliação do resultado obtido, foi utilizado o programa *StepOne Software* v2.1 (Applied Biosystems) *e* foram normalizados através do modelo matemático proposto por Pfaffl (2001). As eficiências da amplificação foram calculadas utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$Ct). Inicialmente foi calculado o ΔCt de cada amostra subtraindo os valores de Ct do gene normalizador dos valores do gene alvo. Essa relação é calculada pela fórmula: [$\Delta CT_{gene\ alvo}$ - $\Delta CT_{gene\ normalizador}$]. Após a determinação do $\Delta\Delta$Ct, aplicou-se a fórmula 2-$\Delta\Delta$Ct e o resultado obtido determinou o valor da expressão gênica relativa.

Os primers, bem como suas temperaturas de amplificação estão relacionados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Primers e condições de amplificação

Gene	Primers (5' - 3')	Temperatura da Amplificação
SDF2	S: 5' - AGCTTCAGCCTGCACATTTGAAC - 3' AS: 5' - TCCATGATGCCAAGCTCCTGAAGA - 3'	60 ºC
sXBP1	S: 5' - TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG - 3' AS: 5' - GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG - 3'	62 ºC
CHOP	S: 5' - TTAAGTCTAAGGCACTGAGCGTATC - 3' AS: 5' - TGCTTTCAGGTGTGGTGATG - 3'	56 ºC
GADD34	S: 5' - AGGACACAGAGGAAGAGGAAG - 3' AS: 5' - TGTAGCAGGAGTGGAAGAGG - 3'	60 ºC
ATF4	S: 5' - GACGGAGCGCTTTCCTCTT - 3' AS: 5' - TCCACAAAATGGACGCTCAC - 3'	58 ºC
YWHAZ	S: 5' - GCCACAATGTTCTTGGCCCATCAT - 3' AS: 5' - TGGTTGGTGACAAGACAGAAGGCT - 3'	60 ºC

5.5 Análise da expressão proteica por *Western Blotting*

Os explantes coriônicos tratados com soro materno saudável ou PE por 24 horas (n = 7) foram previamente armazenados em microtubos de 1,5 µL contendo 200 µL de tampão RIPA (NP-40 a 1%, Na-desoxicolato a 0,25%, NaF 2 mM, NaCl

150 nM, PMSF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, EDTA 1 mM e Tris-HCl pH 7,4), 2 µL de inibidor de protease e 2 µL de inibidor de fosfatase (Sigma) e em seguida armazenadas em freezer -80 °C. Para esta análise, as amostras foram lisadas no homogeneizador de tecidos Precellys® (Bertin Corp.) e então centrifugadas por 15 min a 12.000 rpm, 4°C. O sobrenadante das amostras foi retirado e quantificado utilizando o kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce) conforme instruções do fabricante. Após a quantificação, o volume necessário para a obtenção de 30 µg de proteína total foi diluído em tampão de extração de proteínas (RIPA) para se obter um volume de 20 µL e 5 µL de Laemmli Sample Buffer 4x, para um volume final de 25 µL. As amostras foram aquecidas em banho-Maria a 100°C para a desnaturação das proteínas e adicionadas ao gel de transferência (10% acrilamida) e ao gel de empilhamento para a realização da eletroforese.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Ao término da transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio de sítios inespecíficos com 3% leite desnatado diluído em tampão TBS-T (0,05 M TRIS, 0,1 M NaCl, pH 7,6 contendo 0,1% de Twin-20 - Sigma) sob agitação de 50 rpm por 1h, a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (ver **Tabela 2**), diluídos em leite 3% e mantidas por uma noite sob agitação, a 4°C. Como controle endógeno, também foram avaliados os níveis de β-actina. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e incubadas com os anticorpos secundários (**Tabela 3**) diluídos em leite desnatado 3%, por 1h, a temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas com TBS-T, incubadas com solução quioluminescente Clarity™ ECL Western Blotting Substrate (Bio-Rad) conforme instruções do fabricante e reveladas no G:Box Chemi HR (Syngene). A densitometria das bandas foi quantificada pelo software Image J (NIH). Os dados obtidos foram normalizados pela expressão de β-actina.

Tabela 2 – Anticorpos primários e diluições.

Proteína	Anticorpo	Diluição
GRP78	Anti-GRP78 humano policlonal produzido em cabra (Santa Cruz)	1:1000
eIF2α	Anti-eIF2α humano produzido em coelho (Cell Sinalling)	1:1000
p-eIF2α	Anti-eIF2 humano produzido em coelho (Cell Sinalling)	1:500
SDF2	Anti-SDF2 humano policlonal produzido em coelho (Sigma)	1:1000
β-Actin	Anti-β-Actina produzido em camundongo (Sigma)	1:5000

Tabela 3 – Anticorpos secundários e diluições.

Proteína	Anticorpo	Diluição
Secundário anti-Cabra	Rabbit Anti-Goat IgG (Sigma)	1:1000
Secundário anti-Coelho	Goat Anti-Rabbit IgG (Millipore)	1:1000
Secundário anti-Camundongo	Goat Anti-Mouse IgG (KPL)	1:1000

5.6 Análise do efeito do soro de gestante com PE sobre as células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo

5.6.1 Cultivo e tratamento das células HTR-8/Sv-neo

As células de linhagem trofoblásticas HTR-8/Sv-neo são provenientes de células citotrofoblásticas humanas de primeiro trimestre e foram cedidas gentilmente pelo Dr. Charles Graham (Queen's University, Kingston, Ontario, Canadá). As células foram submetidas ao plaqueamento em triplicata na proporção de $2x10^4$ células/poço com o volume de 500 µL por poço (placa 24 poços, Corning), em meio de cultura RPMI (Gibco) suplementado com 1 % estreptomicina/penicilina, 0,5% gentamicina, 0,25 % anfoterecina B e acrescido de 10% de SBF. As culturas foram mantidas em incubadora à 37ºC, com 5% de CO_2, sob atmosfera úmida. O meio de cultura foi substituído após 24h.

Cada plaqueamento foi realizado em placas separadas de acordo com seu respectivo período de incubação. Após este período, o meio RPMI foi removido, as

células lavadas com PBS e em seguida recceberam 500 µL de meio RPMI contendo 10% de soro de gestantes saudáveis ou com PE. As células permaneceram em condições de cultivo por 3, 6, 12 e 24 horas, e em seguida coletadas para avaliação.

Este estudo incluiu os seguintes grupos experimentais: **SS-3H; SS-6H; SS-12 h; SS-24 h** (culturas que receberam o soro de gestantes saudáveis cultivadas por 3, 6, 12 e 24 horas, respectivamente); **SPE-3H; SPE-6H; SPE-12 h; SPE-24 h** (culturas que receberam o soro de gestantes com PE em tempos equivalente aos dos experimentos controle).

5.6.2 Ensaio atividade citotóxica por LDH

A determinação da atividade citotóxica que ocorreu nas células da linhagem trofoblástica HTR-8/Sv-neo tratadas por 12 e 24 horas com soro de gestantes saudáveis e com PE (n = 6) foi realizada pela mensuração de LDH (lactato desidrogenase). Os procedimentos seguiram o mesmo protocolo utilizado para os explantes de vilos coriônicos e descritos no item 5.4.3.

5.6.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (*q*-PCR)

5.6.3.1 Preparação das mostras para RT-qPCR

A extração do RNA das células trofoblásticas HTR-8/SV-neo tratadas com soro materno saudável/PE por 3, 6, 12 e 24 horas (n = 6), foi realizada utilizando o PureLinkTM RNA Mini Kit (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, após a retirada do meio RPMI contendo o soro, as células foram lavadas com PBS estéril e em seguida foi adicionado 300 µL do tampão de lise e 3 µL de 2-mercaptoetanol (Sigma) Em seguida, todo o conteúdo foi acondicionado em microtubos de 1,5 µL previamente autoclavados. As células foram lisadas com seringas de 1 mL e centrifugadas a 12000 g, por 15 minutos. Logo depois, adicionou-se 300 µL de álcool etílico 70% e todo o conteúdo foi transferido para uma coluna, onde sofreu sucessivas lavagens. A concentração de

pureza do RNA total foi calculada pelo espectrofotômetro ND-1000 NanoDrop (NanoDrop). nas absorbâncias de 230, 260 e 280 nm e por meio da relação A260/A280, respectivamente.

Todos os procedimentos posteriores de remoção do DNA genômico e síntese de cDNA, seguiram os mesmos procedimentos utilizados para explantes de vilos coriônicos descritos no item 5.4.4.

5.6.3.2 *Real Time q*PCR

A avaliação da expressão gênica de *SDF2*, *CHOP*, *GADD34* e *YWHAZ* foi realizada em triplicata (n = 6) usando o sistema de PCR em tempo real Step One Plus™. O preparo do cDNA, do Power UP SYBR Green PCR Master Mix™ e as condições de ciclo térmico utilizadas foram descritas no item 5.4.4.4. O gene da *YWHAZ* foi utilizado como normalizador para cada RNAm analisado, além das amostras para controle negativo e amostras controle sem cDNA. O valor da expressão gênica relativa se deu a partir do método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$Ct). Os primers e temperaturas de amplificação utilizadas nesta análise estão listadas na **Tabela 1.**

5.6.4 Análise da expressão proteica por *Western Blotting*

Nesta análise, foi avaliada a expressão proteica de SDF2, eIF2α e p-eIF2α. Os anticorpos primários e secundários, bem como as diluições utilizadas estão descritas nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Os procedimentos seguiram o mesmo protocolo descrito anteriormente para explantes de vilos coriônicos no item 5.5.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística entre as amostras foi calculada utilizando o software PRISM 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Dados com distribuição normal que foram comparados apenas em relação ao controle foram analisados pelo teste não pareado *t* de *Student*, com pós-teste de *Welch*, quando as variâncias eram diferentes. Quando realizadas múltiplas comparações foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram comparados teste *U* de Mann-Whitney (controle *vs.* experimento) ou por meio de comparações múltiplas utilizando-se o teste Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Os resultados foram expressos em média ± DP. Os valores foram considerados estatisticamente relevantes quando $p \leq 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1. Características clínicas do estudo da população

As características clínicas populacionais e desfechos gestacionais como, idade materna, idade gestacional, número de gestações, número de partos anteriores, peso da placenta (g) pressão sanguínea (sistólica e diastólica), proteinúria (g/*24 h*) e peso do recém-nascido (Kg) são mostradas na **Tabela 4.** Entre as gestantes saudáveis e gestantes com PE não foi observado diferença significativa em relação a idade materna. A idade gestacional nas mulheres saudáveis variou em torno de 39 semanas e nas mulheres com PE, 34 semanas (p = 0,0064). O número de gestações anteriores entre as gestantes saudáveis foi maior do que nas pacientes com PE (p = 0,014). A avalição da pressão sanguínea das pacientes com PE foi maior que das pacientes saudáveis (p=0,0007, sistólica e p=0,0065, diastólica) corroborando os dados clínicos evidenciados nesta patologia. O peso da placenta (p = 0,0036), bem como o peso do recém-nascido (p = 0,0003) foi menor nas pacientes com diagnóstico de PE. Além disso, dois neonatos foram diagnosticados com RCF (peso do RN: 1,9Kg, idade gestacional 37 semanas e sexo feminino; peso do RN: 2,3Kg, idade gestacional 37 semanas e sexo masculino). A proteinúria foi avaliada apenas nas gestantes com PE e apresentaram em média 5,2 g/L em 24 horas. A cor da pele das gestantes também foi avaliada. Entre as pacientes com PE, apenas uma era de cor preta (14,2%) e seis eram de cor branca (85,8%). Já entre as gestantes saudáveis, duas eram de cor parda (28,5%) e cinco eram de cor branca (71,5%). Todas as pacientes com PE faziam uso de hipertensivos como Metildopa, Neozine, Anlodipino, Carvedilol, Hidralazina e Amiodarona.

Tabela 4 – Características clínicas e desfechos gestacionais das pacientes saudáveis e com PE. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média.

	Saudável (n=7)	PE (n=7)
[#1]**Idade Materna**	29,14 ± 1,62	26,43 ± 2,48
[#1]**Idade Gestacional**	39 ± 0,30	34,04 ± 1,27*
[#2]**Número de Gestações**	3,28 ± 0,40	1,28 ± 0,18*
[#2]**Número de Partos**	1,85 ± 0,60	0,28 ± 0,18*
[#1]**Peso da Placenta**	493,7 ± 52,18	255,3 ± 36,66**
[#1]**PTU (24 h g/L)**	NA	5,2
[#2]**Pressão Sanguínea (mmHg)**		
Sistólica	117,5 ± 4,78	180,3 ± 10,22**
Diastólica	72,5 ± 2,5	107 ± 5,13*
[#2]**Peso do Recém-Nascido (kg)**	3,32 ± 0,13	2,2 ± 0,19**

[#1]Teste *t* de Student; [#2] Teste U de Mann Whitney. */**Significativamente diferente em relação aos dados encontrados para as gestantes saudáveis. *p<0,05; **p<0,005.

7.2 Expressão dos fatores vasoativos sFlt-1 e PlGF no soro das gestantes saudáveis/PE

O perfil dos fatores vasoativos sFlt-1 e PlGF foi avaliado nas amostras de soro de pacientes saudáveis e PE (n = 4, cada), em triplicatas **(Figura 4)**. Níveis reduzidos significativos de PlGF (127 ± 1,68 pg/mL; p = 0,02) e níveis aumentados de sFlt-1 (12076 ± 1310 pg/mL; p = 0,0017) caracterizaram o soro de pacientes com PE em relação ao soro de gestantes saudáveis (PlGF, 773 ± 9,36 pg/mL; sFlt-1, 4137 ± 19,94 pg/mL). A razão sFlt-1/PlGF também foi significativamente diferente nos dois grupos estudados (saudáveis, 5,4 ± 0,05 pg/mL; PE, 94,7 ± 10,25 pg/mL; p=0,0286).

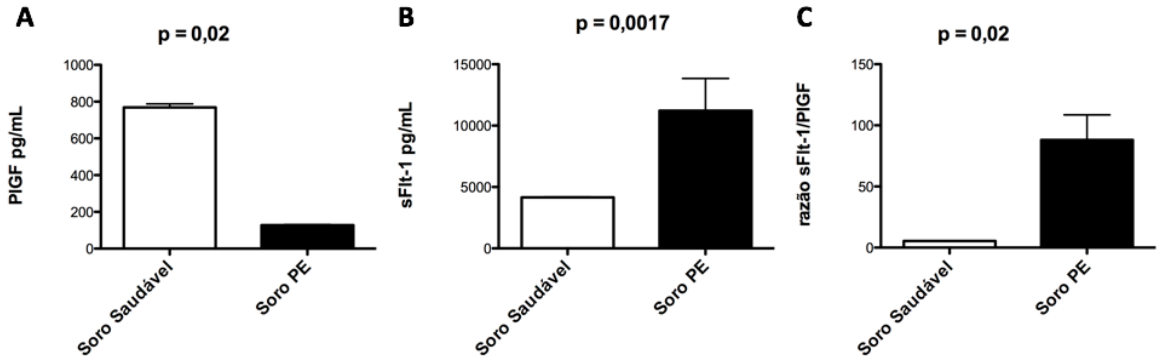


Figura 4 - Expressão dos fatores vasoativos sFlt-1 e PlGF no soro de pacientes saudáveis (barras brancas) e de PE (barras pretas). Os níveis séricos de PlGF (**A**) foram menores em gestantes com pré-eclâmpsia do que em pacientes saudáveis (p = 0,02), enquanto os níveis séricos de sFlt-1 (**B**) foram maiores em pacientes com PE em comparação com pacientes saudáveis (p = 0,0017), como observado em a razão entre sFlt-1/PlGF (**C**, p = 0,0286). Os dados foram analisados pelo teste *U* de Mann-Whitney. Os valores estão representados como mediana ± erro padrão médio.

7.3 Avaliação dos efeitos do soro de gestantes com PE sobre os explantes coriônicos de gestantes saudáveis

7.3.1. Atividade metabólica

Para avaliar os efeitos do soro de gestantes com PE sobre as células trofoblásticas foi necessário identificar que quantidade (em mg) de tecido deveria ser coletada e submetida aos experimentos *in vitro*. Neste sentido, explantes coriônicos de placentas saudáveis, em variações entre 5 mg e 50 mg (n=3) e seus respectivos conteúdos de proteína foram relacionados aos dados obtidos pelo ensaio de atividade metabólica pelo MTT.

Os resultados obtidos mostraram que nos valores de 40 e 50 mg de tecido, os níveis de atividade metabólica das células do explante era muito baixa em relação aos demais pontos analisados (50 mg x 5,10,20, e 30 mg, $p<0,05$; 40 mg x 20 mg, $p<0,05$). Desta forma, selecionou-se o valor de 30 mg de vilos para os ensaios experimentais, na medida em que esta quantidade de tecido apresentava alta atividade metabólica e quantidade adequada de proteínas extraídas para os ensaios

programados. Embora maiores quantidades de tecido fresco fornecessem maiores quantidades de proteínas, a diminuição da atividade metabólica nestes casos poderia comprometer os ensaios subsequentes (**Figura 5**).

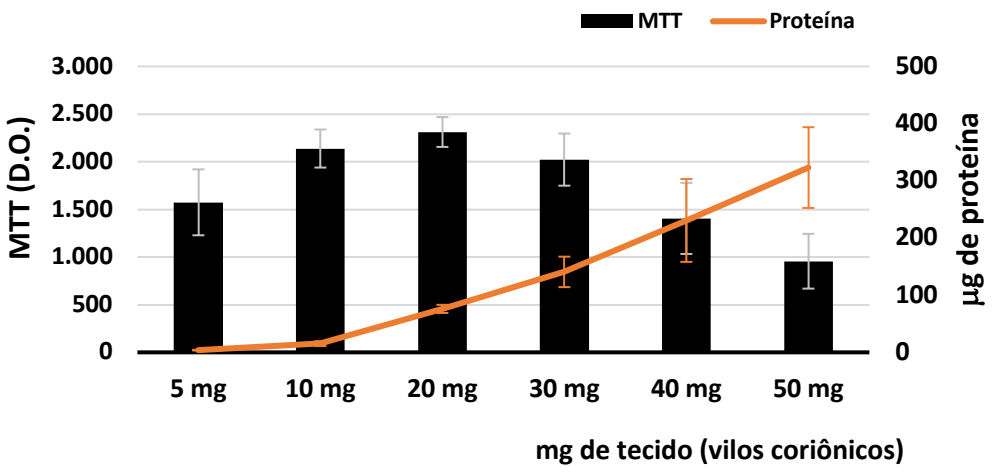


Figura 5 – Relação entre atividade metabólica e quantidade de tecido *versus* **quantidade de proteínas extraídas.** Explantes coriônicos de gestantes saudáveis (n = 3). Os dados são representados em absorbância (MTT) por mg de tecido e microgramas de proteína. D.O. densidade óptica. Os dados estão representados em valores médios ± DP.

Uma vez estabelecida a preparação das amostras, analisou-se a atividade metabólica dos vilos coriônicos de gestantes saudáveis (n=7) tratadas com soro de gestantes saudáveis (controle) e de gestantes com PE, por 24 h. A atividade metabólica dos explantes tratados com soro de gestantes PE (**Figura 6)** foi menor (1.393 ± 718,3; p = 0,007) do que a atividade metabólica dos explantes tratados com soro saudável (2.048 ± 123,8).

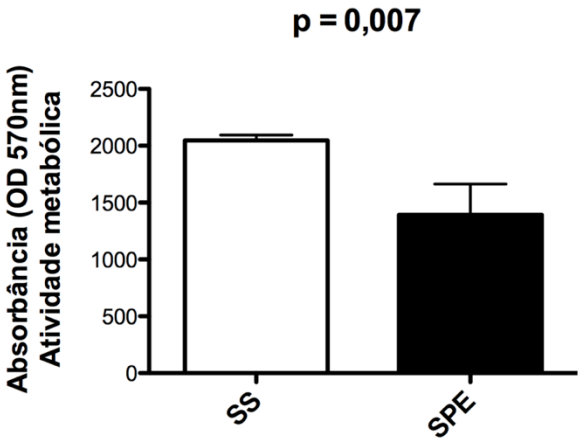


Figura 6 – Redução da atividade metabólica dos explantes coriônicos de gestantes saudáveis tratados com soro de gestantes PE (SPE) (n=7). Ensaio de MTT. PS, placenta saudável; SS, soro de getantes saudáveis; SPE, soro de gestantes com PE; D.O. densidade óptica. Os dados foram analisados pelo teste U de *Mann-Whitney* e representados como média ± DP**.**

7.3.2 Atividade citotóxica

Uma possível atividade citotóxica do soro de gestantes com PE sobre a placenta saudável foi avaliada de acordo com a quantidade de lactato desidrogenase (LDH) liberada, após o tratamento com soro PE por 24 horas. Aumento significativo foi observado na liberação de LDH foi observado nos explantes tratados com soro de gestantes com PE (103,4 ± 15,31; p = 0,01; n=7) em relação aos tratados com soro de gestantes saudáveis (85,51 ± 9,94) (**Figura 7**)

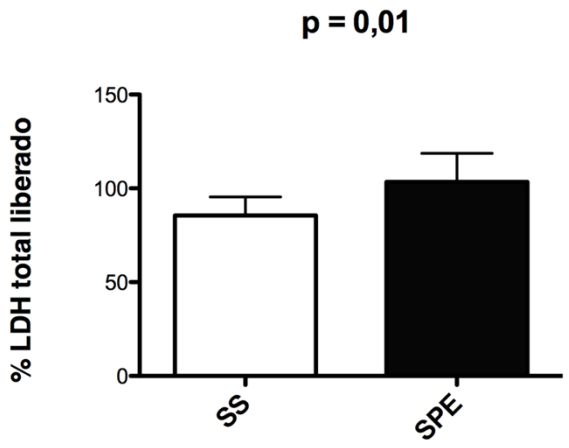


Figura 7 – **Níveis de LDH liberados pelos explantes coriônicos após tratamento com soro de gestantes saudáveis (SS) e com PE (SPE), por 24 horas.** A liberação de LDH foi maior nos explantes coriônicos tratados com soro de gestantes PE, quando comparada aos explantes tradados com soro de gestantes saudáveis (n = 7). PS, placenta saudável; SS, soro de getantes saudáveis; SPE, soro de gestantes com PE. Os dados foram analisados pelo teste *U* de Mann-Whitney e representados como média ± DP.

7.3.3 Ativação da via de estresse de RE nos explantes coriônicos tratados com soro PE

7.3.3.1 Expressão gênica dos marcadores de estresse de RE

Para avaliar se o soro de gestante com PE poderia ativar a via UPR nos explantes coriônicos de gestantes saudáveis cultivados por 24 horas, determinamos os níveis de mRNA dos fatores *GADD34*, *CHOP*, *sXBP1*, *ATF4* e *SDF2* por PCR em tempo real.

Em relação aos seus respectivos controles (explantes tratados com soro de gestantes saudáveis (SS), os explantes coriônicos tratados com soro PE (SPE) mostraram um aumento da expressão de *GADD34* (SS: 1,04 ± 0,3 *vs*. SPE: 2,67 ± 1,23; p=0,02; n=7) (**Figura 8A**), *CHOP* (SS: 0,98 ± 0,27 *vs*. SPE: 1,83 ± 0,79; p= 0,0001; n=7) (**Figura 8B**) *e SDF2* (SS: 1,02 ± 0,22 *vs.* SPE: 1,63 ± 0,40; p= 0,03; n=7) (**Figura 8E**) A expressão de *ATF4* e *sXBP1* não apresentou alterações significativas entre os grupos avaliados (**Figura 8C, D**).

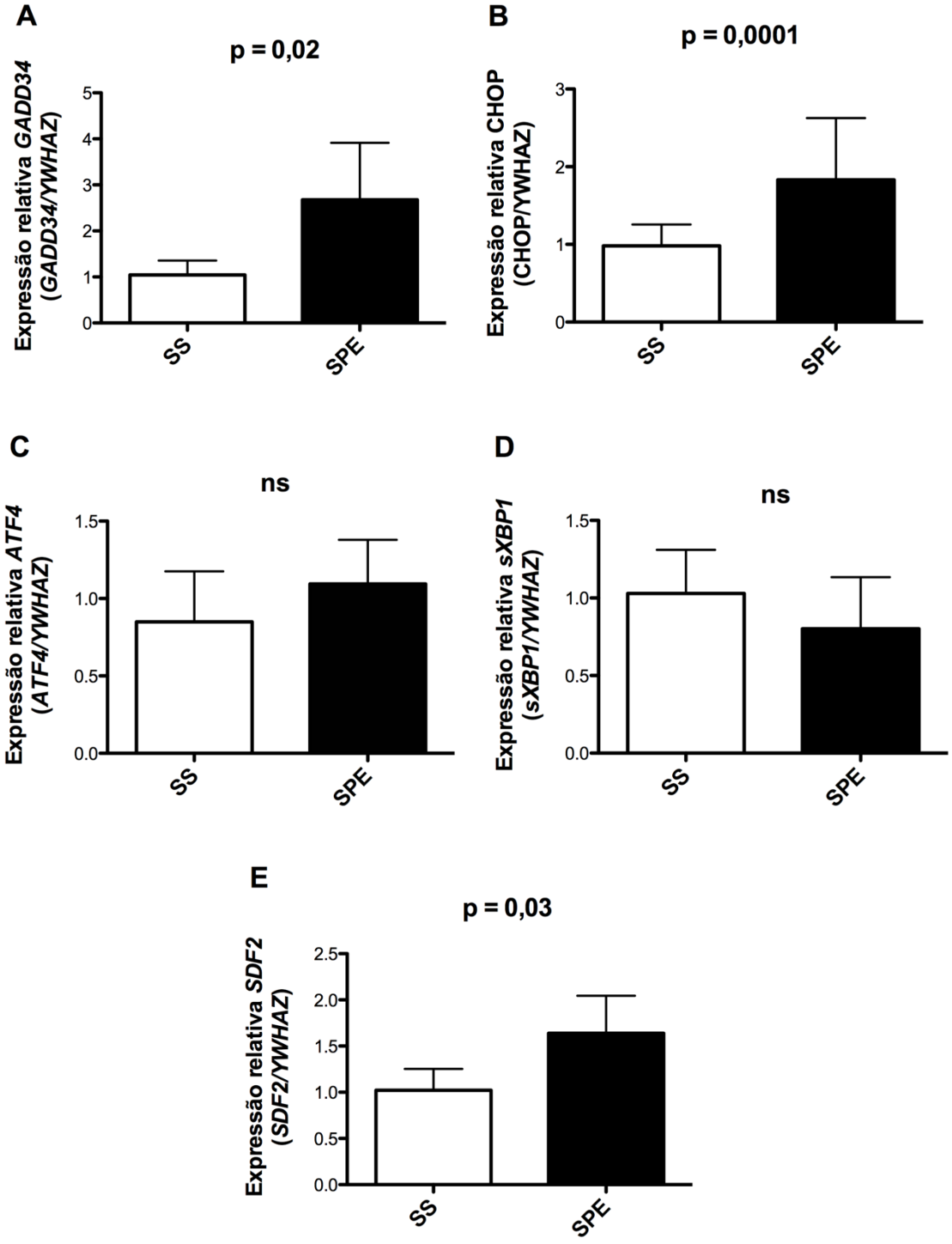

A
p = 0,02
Expressão relativa GADD34 (GADD34/YWHAZ)
0
1
2
3
4
5
SS
SPE
B
p = 0,0001
Expressão relativa CHOP (CHOP/YWHAZ)
0
1
2
3
SS
SPE
C
ns
Expressão relativa ATF4 (ATF4/YWHAZ)
0.0
0.5
1.0
1.5
SS
SPE
D
ns
Expressão relativa sXBP1 (sXBP1/YWHAZ)
0.0
0.5
1.0
1.5
SS
SPE
E
p = 0,03
Expressão relativa SDF2 (SDF2/YWHAZ)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
SS
SPE

Figura 8 – Expressão gênica dos marcadores de extresse de RE nos explantes coriônicos de gestantes saudáveis tratados com soro saudável (SS) e soro PE (SPE). (**A-B**) A expressão de *GADD34* e *CHOP* aumentou nos explantes coriônicos de placenta de pacientes saudáveis tratadas com soro de gestantes PE (n=7). (**C-D**) Nenhuma diferença na expressão gênica de *ATF4* e *sXBP1* foi observada entre os grupos. (**E**) Aumento na expressão gênica de *SDF2* nos explantes coriônicos de gestantes saudáveis tratados com soro PE. Os dados foram analisados pelo teste *t* de *Student.* Os dados estão representados como média ± DP.

7.3.3.2 Expressão proteica dos marcadores de estresse de RE

Afim de identificar se o soro de gestante poderia ativar a via de estresse de RE nos explantes coriônicos cultivados por 24 horas, quantificamos a expressão proteica dos fatores GRP78, eIF2α, p-eIF2α e SDF2 por Western Blotting.

A **Figura 9** mostra a expressão proteica de GRP78, SDF2, eIF2α e p-eIF2α nos explantes coriônicos de gestantes saudáveis (n=7) cultivados com soro de gestantes com PE. Na análise densitométrica, é possível observar um aumento significativo na expressão dos fatores GRP78 (SPE: 1,6 ± 0,5; p = 0,02) (**Figura 9A**), e SDF2 (SPE: 1,05 ± 0,5; p = 0,007) (**Figura 9B),** p-eIF2α (SPE: 0,64 ± 0,1; p = 0,01) (**Figura 9D**), quando comparados ao grupo controle (GRP78 - SS: 1 ± 0,3; SDF2 - SS: 0,37 ± 0,1; p-eIF2α - SS: 0,37 ± 0,1). Apenas os níveis de eIF2α foram semelhantes nos dois grupos (SS: 0,6 ± 0,1; SPE: 0,5 ± 0,1) (**Figura 9C**). A razão p-eIF2α/eIF2α também mostrou aumento relevante nas vilosidades tratadas com soro PE (SPE, 1,22 ± 0,18 *vs.* SS, 0,56 ± 013; p = 0,0006) (**Figura 9E**).

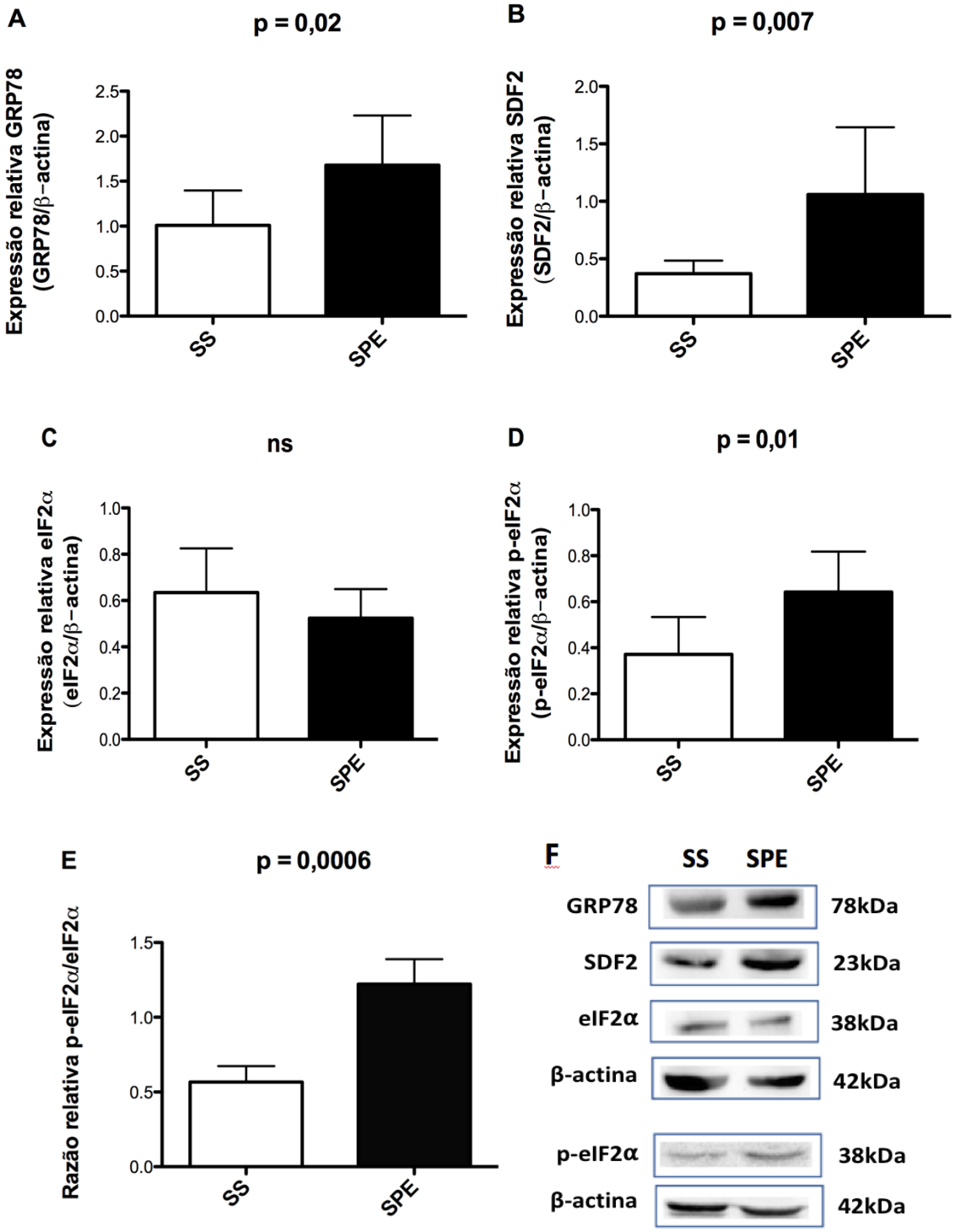

A
p = 0,02
Expressão relativa GRP78
(GRP78/β−actina)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
SS
SPE
B
p = 0,007
Expressão relativa SDF2
(SDF2/β−actina)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
SS
SPE
C
ns
Expressão relativa eIF2α
(eIF2α/β−actina)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
SS
SPE
D
p = 0,01
Expressão relativa p-eIF2α
(p-eIF2α/β−actina)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
SS
SPE
E
p = 0,0006
Razão relativa p-eIF2α/eIF2α
1.5
1.0
0.5
0.0
SS
SPE
F
SS
SPE
GRP78
78kDa
SDF2
23kDa
eIF2α
38kDa
β-actina
42kDa
p-eIF2α
38kDa
β-actina
42kDa

Figura 9. Expressão protéica de GRP78, p-eIF2α e eIF2α total e, SDF2 nos explantes coriônicos, avaliada por *Western Blotting*. (**A,B,C e D**) Os explantes coriônicos de gestantes saudáveis cultivados por 24 h com soro de gestantes com PE apresentam maior expressão de GRP78 (p = 0,02), p-eIF2α (p = 0,01) e SDF2 (p = 0,007) quando comparado aos respectivos controles (explantes de placentas saudáveis tratadas com soro de gestantes saudáveis, **SS**). (**C**) Não houve alteração significativa na expressão de eIF2α entre os grupos. Os valores foram normatizados em função da β-actina. (**E**) A relação p-eIF2α/eIF2α total também está aumentada nos explantes tratados com soro PE (p = 0,0006). (**F**) Membranas representativas da expressão de GRP78, eIF2α total, SDF2 e B-actina. Os dados foram comparados apenas entre soro saudável e com PE dentro de cada fator analisado, pelo teste *U* de Mann-Whitney. Os dados estão representados como média ± DP.

7.4 Avaliação dos efeitos do soro de gestantes com PE sobre as células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo

7.4.1 Efeitos citotóxicos do soro de gestantes sobre sobre as células HTR-8/Sv-neo

A atividade citotóxica do soro de gestantes com PE sobre as células HTR8/Sv-neo cultivados por 12 e 24 h foi avaliada pela quantidade de LDH liberado pelas células no meio de cultivo. Células tratadas com soro de gestantes com PE apresentaram maior liberação de LDH (**Figura 10**), tanto no período de 12 h (HTR8-SPE: 9,01 ± 2,1 *vs.* HTR8-SS: 1,29 ± 0,08; p=0,007), quanto para as células que permaneceram em cultivo por 24 h (HTR8-SPE: 8,67 ± 4,07 *vs*. HTR8-SS: 2,87 ± 1,03; p=0,007).

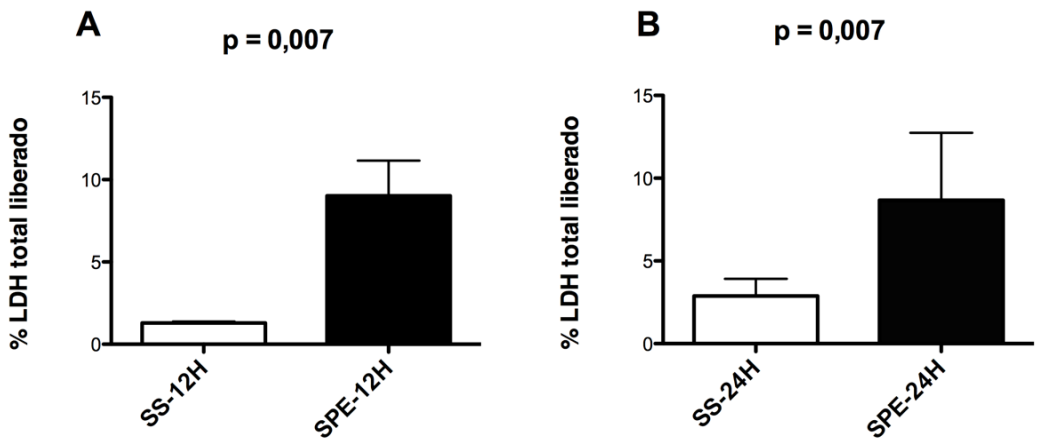


Figura 10 - Níveis de LDH liberados pelas células HTR-8/Sv-neo após tratamento com soro de gestantes saudáveis (SS-12 h) e com PE (SPE-24 h), por 12 h e 24 h. (**A-B**) Os níveis de LDH liberados pelas células HTR-8/SV-neo tratadas com soro PE (n=4) foram significativamente maiores dos que das células tratadas com soro saudável por 12 h (p = 0,007) e 24 h (p = 0,007). SS, soro de gestante saudável; SPE, soro de gestante com PE. Os dados foram analisados pelo teste *U* de Mann-Whitney e representados como média ± DP.

7.4.2 Ativação da via de estresse de RE nas células HTR-8/Sv-neo tratadas com soro de gestantes PE

7.4.2.1 Expressão gênica dos marcadores de estresse de RE

A expressão gênica dos fatores de estresse de RE, *GADD34, CHOP, ATF4* e *SDF2* foi analisada por PCR em tempo real, nas células HTR-8/Sv-neo (n=5) que receberam o soro de gestantes saudáveis e com PE pelo período de 12 e 24 h.

Conforme observado na **Figura 11**, o soro de gestantes com PE ativou a via UPR nestas células. A **Figura 11A** mostra que ocorreu uma alteração na expressão do gene *CHOP* durante o período de tratamento (12 h e 24 h). As células HTR-8/Sv-neo tratadas com o soro PE apresentaram um aumento na expressão deste gene após 12 h e 24 h quando comparada ao grupo controle (12 h - SPE: $15{,}75.10^4$ ± $13{,}45.10^4$ *vs.* SS: 1,49 ± 1,28, p<0,001; 24 h – SPE: $6{,}31.10^4$ ± $3{,}36.10^4$ *vs.* SS: 1,16 ± 0,70; p<0,01). Quando comparamos a expressão de *CHOP* entre os grupos

tratados com soro de gestantes saudáveis e com soro PE nos diferentes tempos (12 h e 24 h) não foi observado diferença significativa.

A avaliação da expressão gênica de *GADD34* é observada na **Figura 11B**. As células tratadas com soro PE mostraram maior expressão de *GADD34* quando comparadas às células tratadas com soro saudável após 12 h de tratamento (SPE: 4,70 ± 0,55 *vs.* SS: 1,02 ± 0,23, p=0,0001). Porém, quando avaliamos as células que receberam o soro PE por 24 horas observamos um pico em sua expressão SPE: 86,21 ± 51,40 *vs.* SS: 1,05 ± 0,30; p=0,0002) quando comparado ao grupo controle. Um crescimento na expressão de *GADD34* ao longo todo tempo, também é observado quando comparamos o grupo tratado com soro PE por 12 h com o grupo tratado por 24 h (SPE-12 h: 4,70 ± 0,55 *vs.* SPE-24 h: 86,21 ± 51,40; p=0,006). Não foi observado alteração significativa entre os grupos controles em função do tempo.

Na **Figura 11C** observa-se que apenas as células HTR-8/Sv-neo que receberam o soro por 24 h apresentaram aumento significativo na expressão de *ATF4* quando comparadas ao grupo controle (SPE: 53,51 ± 11,84 vs. SS: 1,01 ± 0,17; p<0,0001. Nenhuma alteração foi observada na expressão de *ATF4* nas células tratadas com soro saudável e PE por 12 h e nem entre as células tratadas com soro PE por 12 h e 24 h.

A expressão de *SDF2* após 24 h de cultivo e exposição ao soro PE aumentou significativamente quando comparado ao grupo controle (SPE: 401,37 ± 138,08 *vs.* SS: 1,02 ± 0,20; p=0,0001). A expressão de *SDF2* alterou em função do tempo de cultivo (SPE-12 h: 0,54 ± 0,06 vs. SPE-24 h: 401,37 ± 138,08; p = 0,001). Não observamos alterações significativas em relação a expressão de *SDF2* nas células que receberam o soro PE quando comparadas às células que receberam soro saudável e quando comparamos as células que receberam o soro saudável em ambos os períodos de tratamento (**Figura 11D**).

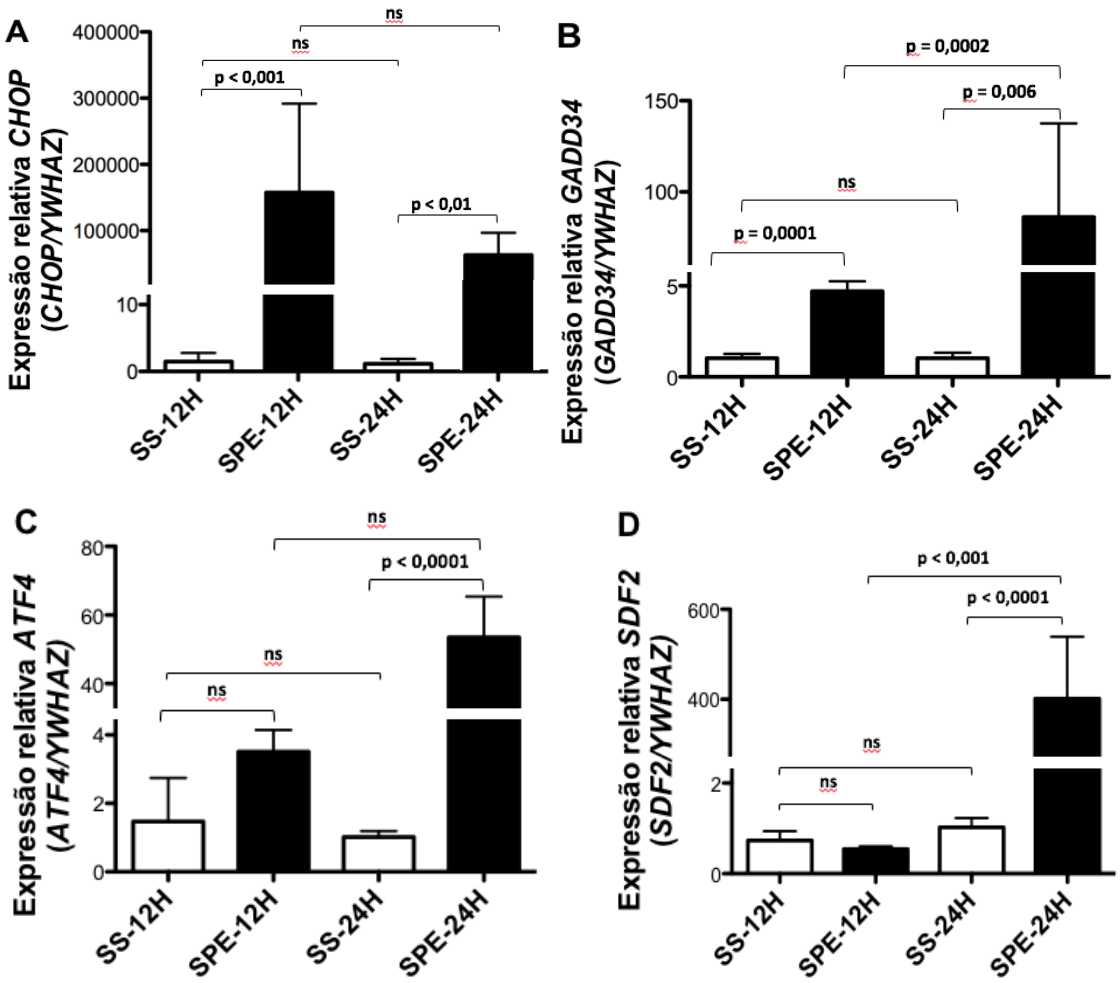

A
Expressão relativa CHOP (CHOP/YWHAZ)
400000
300000
200000
100000
10
0
ns
ns
p < 0,001
p < 0,01
SS-12H
SPE-12H
SS-24H
SPE-24H
B
Expressão relativa GADD34 (GADD34/YWHAZ)
150
100
5
0
p = 0,0002
p = 0,006
ns
p = 0,0001
SS-12H
SPE-12H
SS-24H
SPE-24H
C
Expressão relativa ATF4 (ATF4/YWHAZ)
80
60
40
4
2
0
ns
p < 0,0001
ns
ns
SS-12H
SPE-12H
SS-24H
SPE-24H
D
Expressão relativa SDF2 (SDF2/YWHAZ)
600
400
2
0
p < 0,001
p < 0,0001
ns
ns
SS-12H
SPE-12H
SS-24H
SPE-24H

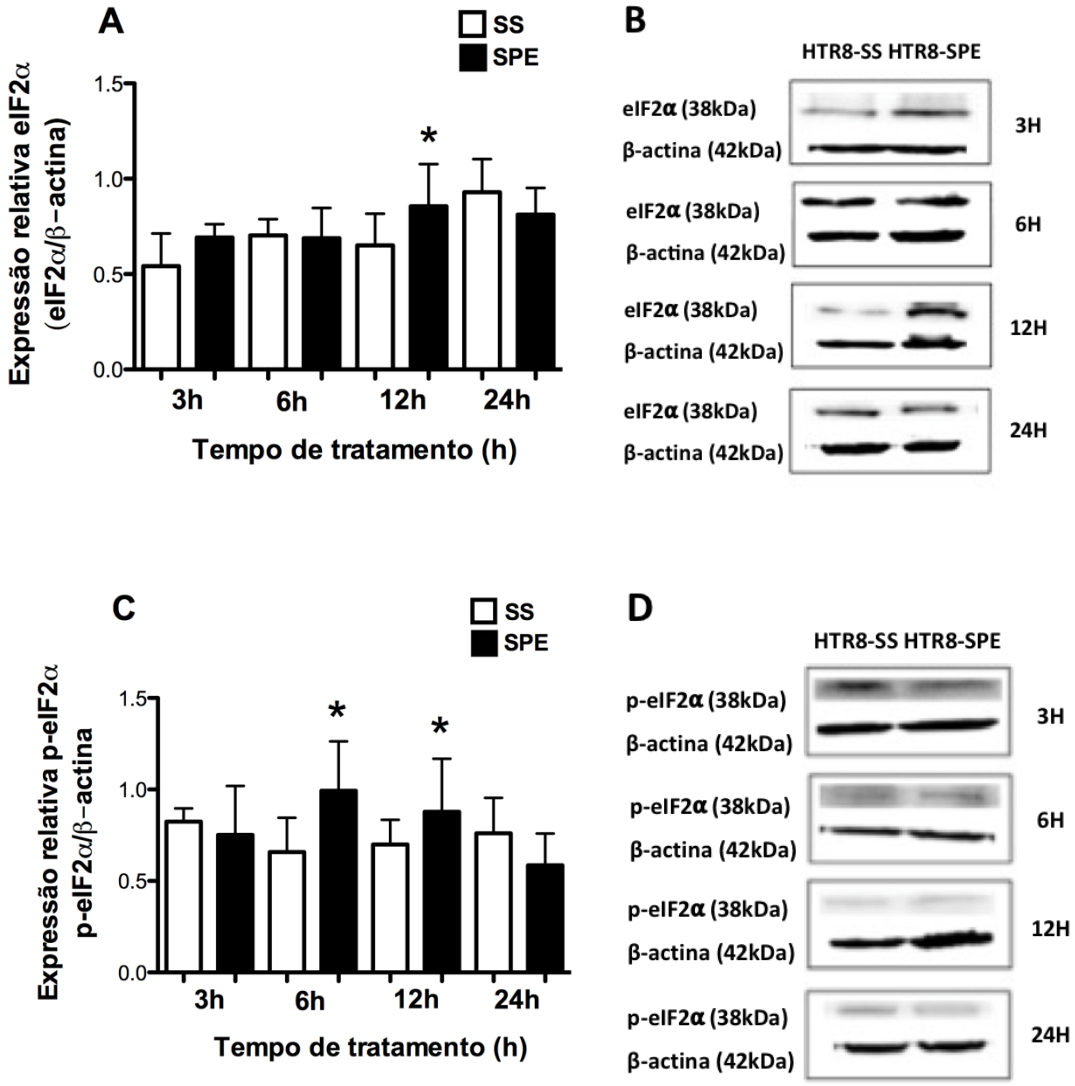
Figura 11 - Expressão gênica de *GADD34, CHOP, GADD34* e *SDF2* em células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo tratadas com soro saudável (SS) e PE (SPE) por 12 h e 24 h. (A) A expressão de *CHOP* aumentou nas células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo tratadas com soro PE por 12 h (p<0,001) e 24 h (p<0,01) quando comparado controles. Não foi observado alteração em sua expressão ao longo do tempo. (**B)** A expressão de *GADD34* aumentou nas células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo tratadas com soro PE por 12 h (p=0,0001) e 24 h (p = 0,0002) quando comparado com os controles. Observou-se um aumento significativo na expressão de GADD34 nas células expostas por 12 h e 24 h (p=0,006). **(C)** Houve aumento na expressão de *ATF4* nas células HTR-8/Sv-neo tratadas com soro PE apenas em 24 h de exposição (p<0,0001) quando comparado controles. Não houve alterações significativas quando comparamos os grupos controles e PR nos diferentes tempos. (**D)** A expressão de *SDF2* nas células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo cultivadas com soro PE por 12 h não foi significativa, mas mostrou-se aumentada nas células cultivadas com soro PE por 24 h (p=0,0001). Os dados paramétricos foram analisados por Anova seguida do pós teste de *Turkey.* Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal Wallis seguidos do pós teste de Dunn. Os gráficos estão representados como média ± DP.

7.4.2.2 Expressão proteica dos marcadores de estresse de RE

A técnica de *Western Blotting* foi utilizada para avaliar a expressão proteica dos fatores eIF2α total e fosforilado (p-eIF2α) e de SDF2 em células HTR-8/Sv-neo tratadas com soro de gestantes saudáveis e com PE por diferentes tempos (3, 6, 12 e 24 h).

Os resultados da expressão proteica estão representados na **Figura 14**. A expressão proteica de eIF2α aumentou no tratamento com soro de gestantes PE após 12 horas (SPE: 0,98 ± 0,10 *vs.* SS: 0,71 ± 0,16; p=0,01; n=5). Não foram detectadas alterações significativas nos demais tempos avaliados (3, 6 e 24 h). O fator eIF2-α fosforilado apresentou aumento significativo nas células HTR-8/Sv-neo tratadas com soro PE após 6 h (SPE: 0,99 ± 0,27 *vs.* SS: 0,65 ± 0,18; p=0,034; n=6) e 12 h de cultivo (SPE: 1,00 ± 0,12 *vs.* SS: 0,69 ± 0,13; p=0,012; n=5). A razão p-eIF2α/eIF2α teve um aumento significativo após 6 horas de tratamento (SPE: 1,45

± 0,0,29 *vs.* SS: 0,93 ± 0,25; p=0,007; n=6). Nos demais tempos avaliados não foram observadas alterações significativas na razão p-eIF2α/EIF2α.



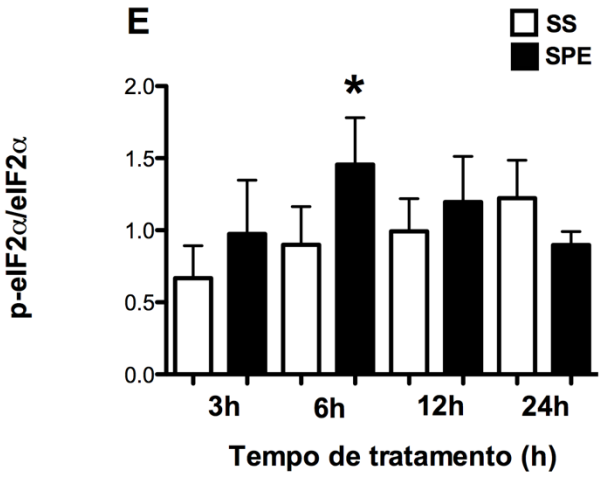


Figura 12 - Expressão proteica (*Western Blotting)* de p-eIF2α e eIF2α total nas células trofoblásticas HTR-8 Sv-neo tratadas com soro de gestantes saudáveis e PE por 3h, 6h, 12 h e 24 h. (A, C) A análise densitometria das bandas de expressão proteica de eIF2α total e p-eIF2α nas células HTR-8/SV-neo tratadas com soro de gestantes saudáveis (SS) e com PE (SPE). Notar o aumento de eIF2α total (**A, C**) após 12 h de exposição ao soro PE (*p = 0,016) e de p-eIF2-α após 6h (*p=0,034) e 12 h (*p=0,012) de tratamento com soro PE em relação aos respectivos controles (SS). **(B, D)** Membranas representativas da expressão de eIF2α total e β-actina e de p-eIF2α e β-actina. **(E)** A razão p-eIF2α/eIF2α total teve um aumento significativo (*p=0,007) após 6 horas de exposição ao soro de gestantes com PE (SPE). Os dados estão representados como média ± DP. Os dados foram analisados pelo teste *t* de *Student* com pós-teste de *Welch* em relação ao controle de mesmo tempo de tratamento.

A expressão protéica de SDF2 nas células HTR8/Sv-neo aumentou após 6h de exposição ao soro das gestantes PE (**Figura 15**) e comparação ao tratamento com o soro de gestantes saudáveis (12 h: SPE: 1,04 ± 0,11 *vs.* SS: 0,80 ± 0,16; p=0,0159 e, 24 h: SPE: 1,18 ± 0,18 *vs.* SS: 0,81 ± 0,23; p=0,0132; n=6).

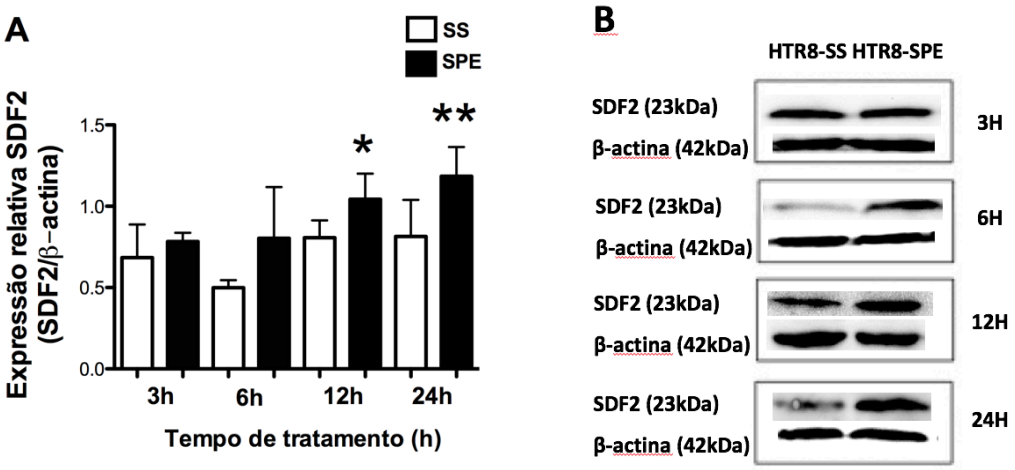


Figura 13 – Expressão proteica de SDF2 nas células trofoblásticas HTR-8/Sv-neo cultivadas com soro de gestantes saudáveis (SS) e com PE (SPE) por 3, 6, 12 e 24 h. (A) Notar o aumento da expressão de SDF2 após 12h e 24h de cultivo com o soro das gestantes com PE (12h: p=0,0159; 24h: p=0,0132) em relação ao controle (soro de gestantes saudáveis, SS) com mesmo tempo de tratamento. **(B)** Membranas representativas da expressão de SDF2 e β-actina. Valores normatizados em função da β-actina (n=6, experimentos realizados em triplicata). Os dados estão representados como média ± DP. Os dados foram analisados pelo teste *t* de *Student* com pós-teste de *Welch* em relação ao controle de mesmo tempo de tratamento.

8 DISCUSSÃO

Nossos dados confirmaram a hipótese de que o ambiente pré-eclâmptico pode alterar o comportamento dos vilos coriônicos. Mostramos que o soro materno pré-eclâmptico interfere na homeostasia do RE e ativa a via UPR nos explantes coriônicos de placentas saudáveis assim como em células trofoblásticas da linhagem HTR-8/Sv-neo.

Sobre a amostra utilizada

Para o delineamento deste estudo era importante a validação dos dados das pacientes pré-eclâmpticas. De modo geral, os dados clínicos apresentados pelas pacientes com PE confirmaram as características desta desordem e suas consequências diretas e indiretas, de acordo com o preconizado pela literatura (Myatt et al., 2014; Bartsch et al., 2016; ACOG, 2019).

Neste estudo, não encontramos diferenças significativas em relação à idade das gestantes PE e saudáveis. Nossa amostragem incluiu mulheres relativamente jovens (idade média de 29 anos e 26 anos, respectivamente para gestantes saudáveis e com PE), sendo aquelas com PE em sua maioria, primigestas, o que se refletiu no menor número de partos em relação às gestantes saudáveis. Estes dados sugerem que este fator de risco predominou no grupo selecionado. Embora a idade materna seja considerada um fator de risco para o estabelecimento da PE, Poon et al. (2010), mostraram que este fator de risco está mais associado à PE tardia do que a PE grave e precoce, uma vez que não houve correlação entre esta desordem e a idade materna. Embora com uma amostragem muito pequena, este estudo corrobora os achados de Poon et al. (2010).

Outras diferenças também foram encontradas entre os dois grupos estudados – gestantes saudáveis e com PE - quanto a idade gestacional, proteinúria, pressão arterial sistólica e diastólica. As gestantes pré-eclâmpticas apresentaram proteinúria e, pressão arterial sistólica e diastólica mais alta do que pacientes saudáveis. Embora proteinúria não seja mais um dos critérios essenciais para o diagnóstico clínico da pré-eclâmpsia, seus níveis são importantes para a predição de resultados adversos maternos e fetais (Dong et al., 2017). Segundo Sarno et al. (2015) tanto

a saúde maternal quanto a fetal durante e após a gestação são drasticamente comprometidas quando a PE precoce está associada a proteinúria precoce, além da hipertensão, o que confirma que nosso grupo estudo, incluía pacientes com PE grave.

Assim como relatado na literatura (Sarno et al., 2015), o peso placentário das gestações com PE selecionadas neste estudo também esteve associado a bebês pequenos para a idade gestacional (PIG) e menor idade gestacional no parto, ambos fatores associados ao agravamento da PE. A antecipação do parto foi realizada como uma medida preventiva e cautelar para a preservação da saúde materna ou comprometimento fetal iminente. Nestes casos, a terapêutica de emergência é a interrupção da gravidez, preferencialmente após a 34a semana de gestação, para resguardar o máximo possível o desenvolvimento fetal (Sarno et al., 2015).

Bebes pequenos para a idade gestacional também são referenciados em casos de PE e atribuídos a insuficiência uteroplacentária, associada à hipertensão (Xiong et al., 2002). Evidencias também mostraram que gestações complicadas por PE de início precoce estão associadas à uma maior taxa de recém-nascidos PIG em comparação com gestações associadas a hipertensão, sugerindo que a influência da fisiopatologia da PE precoce vai além do processo hipertensivo para o desenvolvimento fetal (Ferrazzani et al., 2011).

Kovo et al. (2015) avaliaram o peso placentário e a relação feto-placentária em gestações complicadas pela PE. Os autores observaram que estes fatores eram menores e que a placenta, nestes casos, apresentava mais lesões vasculares. Outros estudos confirmaram estes achados, principalmente quando a PE se instalava em idades gestacionais precoces (Levy et al. 2019; Alnaes-Katjavivi et al., 2020). Essas anormalidades patológicas placentárias podem explicar o peso placentário encontrado em nossas amostras de pacientes com PE.

Em suma, os dados obtidos das pacientes selecionadas confirmam o diagnóstico de PE grave, conforme os dados descritos na literatura.

O perfil sérico de fatores angiogênicos nas gestantes PE selecionadas corrobora dados da literatura

Neste estudo, utilizamos soro de gestantes pré-eclâmpticas selecionadas no Hospital das Clínicas-FMUSP-SP, referência no tratamento de doenças de alta complexidade. Além dos dados clínicos dos pacientes, também avaliamos os níveis de sFlt-1 e PlGF no soro das pacientes participantes deste estudo.

Estes marcadores têm sido úteis no diagnóstico diferencial de distúrbios hipertensivos gestacionais e na previsão do desenvolvimento de resultados adversos e do parto prematuro (Engels et al., 2013). O desequilíbrio entre esses fatores tem sido correlacionado com a gravidade da PE e vem sendo utilizados no diagnóstico da PE (Verlohren et al., 2010; Perales et al., 2017; Caillon et al., 2018).

O guia clínico do *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE, 2016) recomenda a avaliação da razão sFlt-1/PlGF para auxiliar o diagnóstico da PE em mulheres grávidas com suspeita desta patologia. Seguindo estes critérios, pacientes com uma razão sFlt-1/PlGF <38 não deveriam ser consideradas como pré-eclâmpticas. Por outro lado, valores iguais ou superiores a 85 em exames realizados entre 20 e 34 semanas de gestação ou >110 a partir da 34a semana são fortes indicativos de PE (Verlohren et al., 2014; Zeisler et al., 2016).

Em nosso estudo, cerca de 75% das gestantes (com idade gestacional média de 34,04 semanas) apresentaram razão sFlt-1/PlGF acima de 89 pg/mL, o que indica um desbalanço angiogênicos e corroboram os dados descritos na literatura para confirmação de PE (Verlohren et al., 2010; Stepan et al., 2015; Perales et al., 2017; Dragan et al., 2017; Caillon et al., 2018).

O soro de gestantes com PE interfere na atividade metabólica dos explantes coriônicos

Nossa primeira abordagem para avaliar o comportamento dos explantes placentários em cultura foi determinar como o uso de soro pré-eclâmptico poderia afetar o metabolismo celular. Por meio de um método colorimétrico (MTT), que

mede a atividade desidrogenase mitocondrial (Robinson et al., 2008), encontramos uma diminuição significativa na atividade metabólica dos explantes placentários expostos ao soro das gestantes com PE em relação aos explantes mantidos com soro saudável. Estes dados sugerem que fatores circulantes decorrentes da PE estão reduzindo consideravelmente o metabolismo celular.

Para avaliar se essa redução na atividade metabólica geral do explantes vilosos era devido à perda de células (toxicidade) ou desaceleramento de suas atividades, foi avaliada a liberação de lactato desidrogenase (LDH) pelos explantes coriônicos e pelas células HTR-8/Sv-neo. Este ensaio baseia-se na detecção da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular, o que só acontece com células com membranas celulares danificadas, ou seja, em processo de morte celular.

Tanto os explantes placentários, como as células HTR-8/Sv-neo foram negativamente afetadas pela presença do soro de gestantes com PE, o que quer dizer que houve indução de morte celular na presença desse soro. Esses dados parecem ser consistentes com estudos que mostram níveis mais altos de apoptose e de nós sinciciais em amostras placentárias de mulheres pré-eclâmpticas (Tomas et al., 2011). Determinar, entretanto, que moléculas podem estar envolvidas com neste processo, não é uma tarefa fácil. Neste estudo estes possíveis fatores não foram estudados, no entanto, descrevemos abaixo alguns fatores já determinados que poderiam contribuir para explicar nossos achados.

Uma recente análise de perfis peptidômicos usada para rastrear e identificar os biomarcadores de proteínas plasmáticas para predizer a pré-eclâmpsia, mostrou um grande número de proteínas diferencialmente expressas no soro dessas gestantes (Law et al., 2015). Dentre as proteínas relatadas com mais frequência entre os estudos revisados por estes autores, se destacaram a endoglina, a glicoproteína α-2-HS, o fibrinogênio, o plasminogênio além de diferentes apolipoproteínas e a proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina. Vários estudos também relataram um aumento de ácido úrico sérico em mulheres com PE, correlacionado à gravidade da doença (Bainbridge et al., 2008; Martin e Brown, 2010; Masoura et al. 2015; Zhao, Frempong e Duan, 2019). O ácido

úrico é conhecido como um marcador de estresse oxidativo, de alteração da função renal e de lesão tecidual. Esta molécula é produzida em maior quantidade em pacientes com PE como resultado da hipóxia e isquemia placentária e aumento da produção de citocinas pelo organismo materno (Kondareddy e Prathap, 2016). Além disso, níveis aumentados de ácido úrico na circulação ativam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β e IL-6 o que provoca uma retroalimentação do sistema, aumentando o ácido úrico no soro de gestantes com PE (Kanellis et al., 2003; Sultana et al., 2013). Este é um fator que sem dúvida poderia estar interferindo na viabilidade celular dos vilos coriônicos e das células HTR-8/Sv-neo, uma vez que como mostrado nos túbulos renais, ácido úrico aumentado pode estimular a expressão de BAX, provocar alterações na membrana mitocondrial, elevar a produção de espécies reativas de oxigênio, ativar caspases e consequentemente induzir apoptose (Verzola et al., 2014).

As considerações acima fornecem evidências de que o soro de gestantes com PE pode conter fatores que prejudicam a atividade metabólica e a viabilidade celular dos explantes coriônicos e das células HTR-8/Sv-neo. Neste contexto, investigamos a possível ativação e participação da via UPR, neste processo.

O soro de gestantes com PE interfere com as funções do retículo endoplasmático e ativa a via UPR

Nossos achados indicam que o soro de gestantes com PE prejudica a atividade metabólica e a viabilidade celular dos explantes coriônicos e das células HTR-8/Sv-neo. Neste contexto, investigamos a possível ativação e participação da via UPR, neste processo.

Avaliamos inicialmente a chaperona GRP78, pois em resposta ao estresse, ela é prontamente recrutada e desacoplada das proteínas sensoras residentes do RE, PERK, IRE1 e ATF6, assumindo desta forma um papel regulador chave (Kaufmann et al., 2002; Yoshida, 2007). Nossos resultados mostraram que o soro das gestantes com PE induziu a expressão de GRP78 nos explantes coriônicos obtidos de gestações saudáveis, indicando a ativação da via UPR.

Inúmeras evidências têm mostrado também que a indução de GRP78 pode estar associada à ativação direta de mecanismos anti-apoptótico ou pró-sobrevivência da UPR, o que tem sido amplamente observado no câncer (Gazit et al., 1999; Fernandez et al., 2000; Uramoto et al., 2005). Nesta via de atuação direta do GRP78, observou-se bloqueio da ativação de caspases e a ativação de vias paralelas, como a autofágica (Reddy et al., 2003; Li et al., 2008). Neste contexto, a expressão de GRP78 nos vilos coriônicos expostos ao ambiente sérico pré-eclâmptico, além de indicar que este é um ambiente "hostil", interfere com a funcionalidade do RE, marca também o desencadeamento de uma resposta celular para sua recuperação.

A expressão aumentada de GRP78 também foi encontrada em fragmentos placentários de pacientes com PE precoce grave e PE tardia, onde a exposição aos fatores séricos ocorre de forma crônica, inclusive com a participação da própria placenta (Yoshida, 2007; Burton et al., 2011; Yung et al., 2014; Fu et al., 2015; Mochan et al., 2019; Lorenzon-Ojea et al., 2020). Estes resultados associados aos encontrados neste estudo sugerem que independentemente da cronicidade do insulto (ambiente pré-eclâmptico) a GRP78 se mantém constantemente ativada na tentativa de manter a homeostasia placentária.

Uma vez que a expressão de GRP78 sugere a ativação da via UPR, nosso passo seguinte foi avaliar que ramo da via UPR poderia estar sendo ativada. Nossos estudos então focaram para a possibilidade de ativação da via PERK, analisando a expressão de eIF2α e sua ativação por fosforilação, o que está intrinsicamente relacionado a sua capacidade de inibir a síntese de novas proteínas, mas permitindo a expressão de ATF4 e CHOP (Palam, Baird e Wek 2011).

Nossos dados mostraram que a exposição por 24 h ao soro de gestantes com PE, aumenta os níveis de fosforilação de eIF2α (p-eIF2α), o que foi confirmado pela razão p-eIF2α/eIF2a. Para identificar a dinâmica desta ativação, utilizamos a linhagem de células trofoblásticas HTR8/Sv-neo expostas ao soro por diferentes períodos. Nossos dados mostraram que houve aumento na fosforilação de eIF2α, confirmando o poder indutor do soro PE. No entanto, esta indução não seguiu a dinâmica esperada para comparação com os vilos coriônicos. A fosforilação de

eIF2α ocorreu nestas células após 6 h de exposição ao soro PE e não se manteve por 24 h como observado nos vilos coriônicos.

As diferenças entre o tempo de ativação das células HTR8/Sv-neo e os vilos coriônicos podem estar vinculadas a diferentes aspectos. Entretanto, o perfil destas células placentárias oriundas de placentas precoces pode ter influenciado na dinâmica de ativação de eIF2α, uma vez que o comportamento das células trofoblásticas varia ao longo da vida placentária. Neste contexto, estas células podem apresentar mecanismos de proteção próprios para desvio dos caminhos de morte celular, principalmente aqueles envolvidos com a ativação da UPR.

A fosforilação de eIF2α resulta no bloqueio da tradução de novas proteínas afim de reduzir os níveis de proteína no lúmen do ER (Yung et al, 2008), mas aumenta a tradução seletiva de ATF4 para a indução de genes alvos da UPR. Nossos resultados, no entanto, não mostraram aumento na expressão de *ATF4* nos vilos coriônicos tratados com soro PE. Este resultado poderia estar associado a uma falta de ativação da via PERK ou uma ativação temporalmente diferente da analisada em nosso estudo, o que necessitaria que outros fatores também ativados por esta via (*downstream*) fossem analisados para alguma conclusão.

A análise da ativação de *ATF4* nas células HTR8/Sv-neo, reforçou a capacidade indutora de estresse ao RE do soro PE, mas mostrou um cenário diferente do observado nos vilos coriônicos, com uma ativação crescente em função do tempo de exposição ao soro PE. Estudos recentes mostram que o ATF4 é um fator-crítico no crescimento e sobrevivência do câncer, uma vez que pode ativar mecanismos anti-apoptóticos (Rozpedek et al., 2016). Em câncer de próstata foi mostrado por análises proteômicas que a expressão de ATF4 aumenta assim como de genes alvo deste fator de transcrição, mediando processos de sobrevivência tumoral (Pällmann et al., 2019). Esses dados sugerem que a via ativada por ATF4 e seus genes alvos são vitais para o crescimento de determinados tumores ou de células que podem desviar o curso induzido de apoptose. Células HTR8/Sv-neo simulam o perfil de células trofoblásticas extravilosas, com um potencial invasivo muitas vezes comparado ao de tumores (Bischof e Campana, 2000; King et al., 2000; Frank et al., 2001). Por outro lado, poucas são as características fenotípicas

e funcionais compartilhadas entre estas células e o sinciciotrofoblasto, principal alvo do soro materno nos vilos coriônicos. Desta forma, não é de todo surpreendente que diferenças possam ser encontradas.

A ativação de *ATF4* nos vilos coriônicos tratados com soro PE, foi confirmada na medida em que observamos aumento de expressão de genes associados à sua ação nuclear: os genes *GADD34* e *CHOP*. Os explantes apresentaram aumento tanto na expressão de CHOP, um fator de transcrição que controla genes envolvidos na apoptose, quanto na expressão de GADD34, que atua na desfosforilação de p-eIF2α, permitindo que a tradução proteica seja retomada, se a homeostase do RE for restaurada (Brush, Weiser e Shenolikar, 2003; Burton e Yung, 2011). No entanto, a regulação dos destinos de sobrevivência e morte celular nos vilos, neste experimento, não foi estudado de forma direta, mas sim por meio da atividade metabólica e da viabilidade dos vilos expostos ao soro PE. Estes dados são consistentes com uma interferência na viabilidade celular, o que pode ter sido ativado pela expressão aumentada de CHOP como observado em outros modelos (Zinszner et al., 1998; Lorenzon-Ojea, 2016).

De modo geral, o efeito apoptótico induzido pela via UPR ocorre quando as funções do RE são gravemente prejudicadas em prol dos mecanismos funcionais normais, o que ocorre pela ativação de proteínas essenciais como CHOP e caspases associadas ao RE, entre outras (Rutkowski e Kaufman, 2004). O papel de CHOP neste processo pode ser estimado em experimentos em que sua expressão foi neutralizada ou sua atividade bloqueada, o que impediu as células de responder ao estresse do RE com apoptose, confirmando seu papel como fator de transcrição que regula genes envolvidos com a morte celular (Ferri e Kroemer, 2001; Bruhat et al., 2000).

Como fator de transcrição, CHOP pode regular os genes pró e anti-apoptose da família *Bcl-2* (*B-cell lymphoma-2*), *TRB3* (*tribbles-related protein3*), e o próprio *GADD34*. Sob estresse, o CHOP regula negativamente a expressão dos genes anti-apoptóticos da familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W), sensibilizando as células à apoptose (McCullough et al., 2001). Esta correlação também foi mostrada em experimentos com cardiomiócitos em camundongos CHOP-/-, em que após a

indução de estresse os níveis de Bcl-2 (anti-apoptose) são mantidos e o de Bax (pró-apoptose) e caspase 3 estão reduzidos (McCullough et al., 2001).

As proteínas apoptóticas da família Bcl2, quando ativadas em resposta ao estresse de RE, liberam Ca^{2+} no citosol, contribuindo para ativar a via intrínseca de apoptose (McCullough et al., 2001). No entanto, o estresse prolongado também pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio via *CHOP*, por meio da ativação de Ero1α (*Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1α*) promovendo um ambiente hiperoxidante que também leva à apoptose (Marciniak et al., 2004).

Se algum ou ambos os mecanismos de indução de morte celular via *CHOP* estão associados ao aumento de expressão deste fator de transcrição, com a exposição ao soro das pacientes com PE, sem dúvida, necessita ser melhor explorado no futuro.

A análise da exposição do soro PE nas células HTR8/Sv-neo também mostrou aumento desses fatores, mas em uma dinâmica temporal diferente. Níveis aumentados de *CHOP* foram observados após 12 horas de exposição, diminuindo após esse período. Por outro lado, ao mesmo tempo que *CHOP* diminui, *GADD34* acompanha a expressão de *ATF4* e aumenta intensamente. Este equilíbrio entre os fatores que determinam a morte celular (inicialmente ativados) e a sobrevivência (*ATF4/GADD34*, em uma fase mais tardia) são consistentes com os mecanismos de resistência das células tumorais, inclusive face a ambientes hostis determinados por quimioterápicos, por exemplo (Holohan et al., 2013). Mais uma vez, a similaridade entre estas células e células invasivas tumorais pode ser mais do que a capacidade invasiva de ambas. Ainda, estas células são dotadas de uma intensa capacidade proliferativa, uma maquinaria que não está presente no sinciciotrofoblasto e que pode ser fundamental para determinar a forma como as células reagem e se protegem ou não de insultos.

As diferenças, entretanto, com os vilos coriônicos são difíceis de explicar com base apenas em nossos experimentos. Mais um fator importante é o fato de termos acompanhado a expressão dos fatores da via UPR nos vilos coriônicos, apenas em um momento da exposição ao soro PE, o que pode ter gerado perdas das modulações possíveis entre esses fatores ao longo do tempo. A via UPR é uma via

de rápida ação, de forma que os resultados observados nos vilos coriônicos, 24 horas após o insulto com o soro PE, pode estar refletindo apenas o efeito acumulativo da exposição com o soro PE, em que indução de morte (*CHOP*) e tentativa de recuperação da homeostase (*GADD34*), ocorram em paralelo.

Assim como *GADD34*, outra via que pode indicar a recuperação da homeostase na UPR é a ativação da via IRE-1 por meio do processamento (*splicing)* do RNAm de *XBP1*. Este RNA codifica um fator de transcrição que ativa genes codificadores de chaperonas e componentes do sistema de degradação das proteínas mal enoveladas (ERAD, ER-*associated protein degradation*), para proteger as células da morte por apoptose induzida pelo estresse de RE (Yoshida et al., 2001; 2007). No entanto, no tempo de exposição ao soro PE, não houve aumento de expressão desse RNAm, o que sugere que essa via não foi ativada. Por outro lado, o delineamento experimental utilizado neste estudo não permite estimar se tempos curtos ou mais prolongados de insulto ao RE poderiam alterar essa resposta. Avaliações mais tardias, entretanto, não são possíveis com explantes placentários de placentas a termo, uma vez que por serem fragmentos de tecido, apresentam um tempo limite para seu uso, com um decaimento de síntese após 48 h de cultivo (James, Stone e Chamley, 2005). A alternativa de utilizarmos vilos de 1º trimestre que apresentam longevidade em cultivo por semanas, não é uma prerrogativa ética em nossa realidade.

Nossos resultados obtidos com a exposição de vilos coriônicos ao soro PE corrobora em parte dados obtidos de análises da via UPR em placentas de pacientes com PE grave associada à restrição do crescimento fetal (Yung et al., 2008). Como nas placentas cultivadas com o soro de pacientes com PE, esses autores observaram aumento no p-eIf2α e de CHOP, mas também de sXBP1. Os autores sugeriram que na PE há uma ativação global da UPR, associada à inibição da síntese proteica e redução da proliferação celular, modificações pós-traducionais no lúmen do RE e, alterações nas secreções placentárias de fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos. Portanto, levando a uma condição limite que pode comprometer o desenvolvimento placentário e fetal, observada nesses pacientes.

Em um estudo recente, Mochan et al. (2019) mostraram que níveis reduzidos de VEGF podem ter influência sobre o estresse do RE em células trofoblásticas. Estes autores submeteram células trofoblásticas da linhagem BeWo, derivadas de coriocarcinoma, ao tratamento com soro de mulheres com PE em concentrações variadas (125-150 pg/mL) de VEGF endógeno ou com soro suplementado com doses maiores de VEGF recombinante (250 pg/mL). Redução nos marcadores de estresse de RE (GRP78, eIF2α, XBP1, ATF6 e CHOP) foi obtida após o tratamento com soro suplementado com VEGF recombinante. O VEGF participa da regulação da sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação das células trofoblásticas (Lala e Nandi, 2016), o que aparentemente contribuiu também para amenizar a resposta via UPR. Apesar de não termos realizado esta avaliação nas gestantes que participaram deste estudo, já é conhecido que gestantes com PE apresentam níveis reduzidos de VEGF (Chung et al., 2004), o que corrobora os achados de Mochan e colaboradores em relação aos ensaios não suplementados com VEGF. Este estudo, publicado recentemente, nos remete à necessidade de avaliar os níveis de VEGF nas nossas pacientes com PE (soro PE), e avaliar a produção de deste fator pelos vilos coriônicos nesta situação. Uma possibilidade é que, além da redução de expressão de PlGF, a expressão de VEGF também tenha sido afetada pelo soro PE.

Não menos importante, porém mais desconhecido, é a expressão de SDF2. Estudos recentes mostram que o SDF2 faz parte de um grupo de proteínas associadas à resposta ao estresse de RE e suas vias de sinalização vinculadas (Lorenzon-Ojea et al., 2016; 2020). A expressão de SDF2 é aumentada após ativação da UPR e seu silenciamento acarreta em um desequilíbrio dos marcadores de sobrevivência/apoptose em células trofoblásticas, associadas ao braço PERK da UPR (Lorenzon-Ojea et al., 2016). A expressão de SDF2 em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia grave é aumentada, assim como em um sistema in vitro de hipóxia/reoxigenação, utilizando linhagens de trofoblasto. Outras condições gestacionais como o trabalho de parto a termo e condições hiperglicêmicas (diabete melito gestacional), também acarretam no aumento da expressão de SDF2 (Lorenzon-Ojea et al 2020; 2021). De uma forma geral, há uma associação da

expressão de SDF2 com o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como ocorre nas condições de pré-eclâmpsia grave, trabalho de parto e diabetes gestacional (Lorenzon-Ojea et al., 2020; 2021).

Nossos resultados mostram aumento na expressão gênica e proteica do SDF2 frente à exposição ao soro PE tanto nos explantes oriundos de placentas saudáveis como nas células HTR-8/Sv-neo. Nos explantes, o aumento da expressão proteica de SDF2 após tratamento com soro de mulheres diagnosticadas com pré-eclâmpsia, corrobora com os resultados publicados anteriormente, que avaliou a expressão de SDF2 em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia grave (Lorenzon-Ojea et al., 2020). Além disso, nossos resultados também mostram um aumento da expressão gênica de SDF2, que ocorre concomitante ao aumento da expressão gênica de CHOP e GADD34, como discutido anteriormente. Na linhagem HTR-8/Sv-neo, a expressão gênica de SDF2 também se mostrou aumentada após período de 24 h, semelhante ao padrão do apresentado por ATF4. O fator ATF4, assim como GADD34 e CHOP são ativados pelo braço PERK da via UPR. A expressão de CHOP, porém, não é exclusiva da via PERK, podendo ser ativado pelas vias IRE1 e ATF6 (Li et al., 2014). Em conjunto com os resultados de expressão gênica de SDF2 nos explantes, nossos resultados podem sugerir uma relação da ativação da via PERK com o aumento da expressão gênica de SDF2, assim como sugerido anteriormente que a expressão proteica de SDF2 é regulada por este braço da via UPR (Lorenzon-Ojea et al., 2017). A expressão proteica de SDF2 também se mostrou aumentada nas culturas de células trofoblásticas HTR8-SV-neo após período de 12 e 24 h. Esses resultados mostram uma ativação da expressão de SDF2 em um momento imediatamente posterior do aumento da expressão de p-eIF2α (6 h), fator que inibe a síntese global de novas proteínas, mas que permite a tradução seletiva de algumas proteínas, como o fator de transcrição ATF4.

Em um estudo anterior, realizado por nosso grupo, o silenciamento de SDF2 interferiu na expressão de alguns dos fatores de estresse de RE com uma antecipação da expressão de GRP78, aumento na expressão de CHOP e diminuição na produção de caspase3/ATP indicando um papel desta proteína no

controle da sobrevivência/apoptose da resposta ao estresse de RE do trofoblasto (Lorenzon-Ojea,2014; 2016). Os resultados aqui apresentados mostram uma relação semelhante onde a expressão de CHOP pode ser associada a níveis mais altos de SDF2. Embora a expressão de SDF2 seja mais baixa nas células BeWo tratadas com tunicamicina (indutor de estresse de RE pelo bloqueio de N-glicosilações), podemos considerar que os mecanismos de ativação da UPR são diferentes nessas situações, já que nos experimentos anteriores, o efeito da exposição aguda à tunicamicina foi observada por uma queda após 6 h e posterior recuperação dos níveis proteicos após 24h em células trofoblásticas BeWo, uma linhagem trofoblástica de coriocarcinoma. Nestes experimentos avaliamos o efeito do soro de mulheres com pré-eclâmpsia, com a premissa de que os fatores pró-inflamatórios presentes exacerbadamente nessa condição possam desencadear, de forma distinta que o fármaco tunicamicina, a via de estresse de RE. Além disso, as diferenças biológicas entre os explantes coriônicos e células trofoblásticas derivadas de placentas de primeiro trimestre (HTR-8/Svneo) em relação às células derivadas de coriocarcinoma (BeWo), podem justificar diferentes mecanismos para lidar com estímulos de morte e apoptose. De qualquer forma, as consequências dos diferentes insultos e como o SDF2 é modulado em qualquer uma dessas condições ainda são desconhecidas.

Em suma, corroboramos com a hipótese de que o SDF2 está associado a regulação de sobrevivência/apoptose, com o aumento de sua expressão gênica e proteica em uma condição de baixa viabilidade celular e com o aumento de outros fatores da via de estresse que indicam um desbalanço nesta regulação (CHOP). No entanto, essa hipótese precisa ser melhor explorada em outros p experimentais específicos.

9 CONCLUSÕES

A partir dos ensaios realizados neste estudo, pudemos concluir que o soro de mulheres com pré-eclâmpsia:

Reduz a atividade metabólica e a viabilidade celular nos explantes coriônicos e nas células trofoblásticas da linhagem HTR-8/Sv-neo, indicando uma interferência negativa sobre estas células.

Possui fatores capazes de desencadear estresse no retículo endoplasmático das células dos vilos coriônicos provenientes de gestações saudáveis e em células trofoblásticas da linhagem HTR-8/Sv-neo, sugerindo que este soro interfere com a homeostasia destas células.

Ativa uma reposta ao estresse de RE (UPR) via o sensor PERK, que se reflete por um lado na expressão de GADD34, o que indica uma tentativa de restabelecimento da homeostasia celular.

Também induz uma resposta da via UPR mediada por SDF2 e CHOP, o que sugere um destino voltado a morte celular e, portanto, de destruição de células com sistema de síntese incapaz de ser regenerado pela injuria causada pelo soro PE.

Em conjunto, nos ensaios in vitro realizados neste estudo, o soro de gestantes com PE comprometeu a homeostasia dos vilos coriônicos (células trofoblásticas) sugerindo que in vivo, mecanismos semelhantes podem estar ocorrendo nas gestantes com PE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ababio GK, et al. Effects of factor v Leiden polymorphism on the pathogenesis and outcomes of preeclampsia. BMC Med Genet. 2019;20(1):189.

Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013 Sep;170(1):1-7.

ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. Obstet Gynecol. 2019;133(1):e1-e25.

Albers RE, et al. Trophoblast-Specific Expression of Hif-1α Results in Preeclampsia-Like Symptoms and Fetal Growth Restriction. Sci Rep. 2019;9(1):2742.

Allaire AD, et al. Placental apoptosis in preeclampsia. Obstet Gynecol. 2000;96:271–6.

Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. J Cell Sci. 1991;99 (Pt 4):681-92.

Armaly Z, et al. Preeclampsia: Novel Mechanisms and Potential Therapeutic Approaches. Front Physiol. 2018;9:973.

Autiero M, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. Nat Med. 2003;9:936 –943.

Baig S, et al. Proteomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in preeclampsia. Clin Proteomics. 2014;11(1):40.

Baig S, et al. Lipidomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in adverse pregnancy outcomes. Placenta. 2013;34(5):436–442.

Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. Placenta. 2008;29 Suppl A(Suppl A):S67-S72.

Bartsch E, et al. 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. 2016;353:i1753.

Bastida-Ruiz D, et al. Endoplasmic reticulum stress responses in placentation - A true balancing act. Placenta. 2017;57:163–169.

Bdolah Y, et al. Relationship between nulliparity and preeclampsia may be explained by altered circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1. Hypertens Pregnancy. 2014;33(2):250–259.

Bell MJ. A historical overview of preeclampsia-eclampsia. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs. 2010;39(5):510-518.

Benschop L, et al. Blood pressure profile 1 year after severe preeclampsia. Hypertension. 2018, 71, 491–498.

Bezerra PC, et al. Family history of hypertension as an important risk factor for the development of severe preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2010;89(5):612-617.

Bird IM, Zhang L, Magness RR. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003;284(2):R245-R258.

Bischof P, Campana A. A putative role for oncogenes in trophoblast invasion?. Hum Reprod. 2000;15 Suppl 6:51-58.

Bittar RE, Pereira PP, Liao AW, Fittipaldi FS. Doença hipertensiva específica da gestação. In: Zugaib M, editor. Zugaib Obstetrícia. 2a ed. Barueri: Manole; 2012. p. 633–62

Brodowski L, Burlakov J, Hass S, von Kaisenberg C, von Versen-Höynck F. Impaired functional capacity of fetal endothelial cells in preeclampsia. PLoS One. 2017;12(5):e0178340.

Brosens I, Brosens JJ, Muter J, Puttemans P, Benagiano G. Preeclampsia: the role of persistent endothelial cells in uteroplacental arteries. Am J Obstet Gynecol. 2019.221(3):219–226.

Brosens I, Dixon HG, Robertson WB. Fetal growth retardation and the arteries of the placental bed. Br J Obstet Gynaecol. 1977.84(9):656-63.

Brosens I, Robertson WB, Dixon HG. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. J Pathol Bacteriol. 1967;93(2):569-79.

Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. Am J Obstet Gynecol. 2002.187(5):1416-23.

Brown MA, et al. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. Pregnancy Hypertens. 2018;13:291–310.

Brown MC, et al. Cardiovascular disease risk in women with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. Eur J Epidemiol. 2013;28(1):1–19.

Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M, Fafournoux P. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. Mol Cell Biol. 2000;20(19):7192-7204.

Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. Mol Cell Biol. 2003 Feb;23(4):1292-303.

Buhimschi IA, et al. Protein misfolding, congophilia, oligomerization, and defective amyloid processing in preeclampsia. Sci Transl Med. 2014;6(245):245ra92.

Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev. 1996;76(3):839–885.
Burton GJ, et al. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. Placenta. 2009;30 Suppl A:S43-8.

Burton GJ, Yung HW. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. Pregnancy Hypertens. 2011;1(1-2):72-78.

Caillon H, et al. Evaluation of sFlt-1/PlGF Ratio for Predicting and Improving Clinical Management of Pre-eclampsia: Experience in a Specialized Perinatal Care Center. Ann Lab Med. 2018;38(2):95-101.

Caniggia I, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). J Clin Invest. 2000;105: 577–587.

Cao SS, Luo KL, Shi L. Endoplasmic Reticulum Stress Interacts With Inflammation in Human Diseases. J Cell Physiol. 2016;231(2):288–294.

Cao Y, et al. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor: endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. J Biol Chem. 1996;271:3154 –3162.

Carr DB, et al. A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2005;193(3 Pt 2):965-972.

Chesley L. Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy, Elsevier, 4th ed. 2015.

Chesley LC. History and epidemiology of preeclampsia-eclampsia. Clinical Obstetrics and Gynecology. 1984; 27(4):801–820.

Chung JY, et al. Differential expression of VEGF, EG-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and pre-eclamptic pregnancies. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(5):2484–90.

Cincotta RB, Brennecke SP. Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. Int J Gynaecol Obstet. 1998;60(1):23-27.

De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. The ultrastructure of acute atherosis in hypertensive pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1975;123(2):164-174.

Deen ME, et al. Risk factors for pre-eclampsia in multiparous women: primipaternity versus the birth interval hypothesis. J Matern Fetal Neonatal Med. 2006;19:79–84.

Dexter I. Hypertensive toxemia of pregnancy. Journal of the American Medical Association. 1943; 122(3), 145.

Dildy GA 3rd, Belfort MA, Smulian JC. Preeclampsia recurrence and prevention. Semin Perinatol. 2007;31(3):135-141.

Djurisic S, Hviid TV. HLA Class Ib Molecules and Immune Cells in Pregnancy and Preeclampsia. Front Immunol. 2014;5:652.
Dong X, et al. Proteinuria in preeclampsia: Not essential to diagnosis but related to disease severity and fetal outcomes. Pregnancy Hypertens. 2017;8:60-64.

Dragan I, et al. Screening for pre-eclampsia using sFlt-1/PlGF ratio cut-off of 38 at 30-37 weeks' gestation. Ultrasound Obstet Gynecol. 2017;49:73–77.

Du L, et al. eNOS/iNOS and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placentas of patients with preeclampsia. J Hum Hypertens. 2017;31(1):49–55.

Engels T, et al. Automated measurement of sFlt1, PlGF and sFlt1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders. Hypertens Pregnancy. 2013 Nov;32(4):459-73.

Evain-Brion D, Malassine A. Human placenta as an endocrine organ. Growth Horm IGF Res. 2003;13 Suppl A:S34-S37.

Falco ML, et al. Placental histopathology associated with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2017;50(3):295-301.

Familari M, et al. Placenta-derived extracellular vesicles: their cargo and possible functions. Reprod Fertil Dev. 2017;29(3):433–447.

Fernandez PM, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. Breast Cancer Res Treat. 2000;59(1):15-26.

Ferrazzani S, et al. Neonatal outcome in hypertensive disorders of pregnancy. Early Hum Dev. 2011;87:445–9.

Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. Nat Cell Biol. 2001;3(11):E255-E263.

Francisco C, et al. Hidden high rate of pre-eclampsia in twin compared with singleton pregnancy. Ultrasound Obstet Gynecol. 2017;50(1):88–92.

Frank HG, et al. Cell culture models of human trophoblast: primary culture of trophoblast--a workshop report. Placenta. 2001;22 Suppl A:S107-S109.

Fu J, et al. Expression of markers of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placenta of women with early and late onset severe pre-eclampsia. Taiwan J Obstet Gynecol. 2015;54(1):19–23.

Fukuda S, et al. Murine and human SDF2L1 is an endoplasmic reticulum stress-inducible gene and encodes a new member of the Pmt/rt protein family. Biochem Biophys Res Commun. 2001.12;280(1):407-14.

Gallazzini M, Pallet N. Endoplasmic reticulum stress and kidney dysfunction. Biol Cell. 2018;110(9):205–216.

García de la Cadena S, Massieu L. Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12. Apoptosis. 2016;21(7):763–777.

Gazit G, Lu J, Lee AS. De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat. 1999;54(2):135-146.

Ghosh R, et al. Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. PLoS One. 2010;5(3):e9575.

Gilani SI, et al. Preeclampsia and Extracellular Vesicles. Curr Hypertens Rep. 2016;18(9):68.

Gonzalez-Gronow M, et al. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. Antioxid Redox Signal. 2009;11(9):2299–2306.

Gorbatyuk MS, Starr CR, Gorbatyuk OS. Endoplasmic reticulum stress: New insights into the pathogenesis and treatment of retinal degenerative diseases. Prog Retin Eye Res. 2020;100860.

Goswami D,et al. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of earlyonset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. Placenta. 2006;27:56–61.

Granger JP, et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. Hypertension. 2001;38(3 Pt 2):718-722.

Gray PC, Vale W. Cripto/GRP78 modulation of the TGF-β pathway in development and oncogenesis. FEBS Lett. 2012;586(14):1836–1845.

Haché S, et al. Alteration of calcium homeostasis in primary preeclamptic syncytiotrophoblasts: effect on calcium exchange in placenta. J Cell Mol Med. 2011;15(3):654–667.

Hailu FG, Yihunie GT, Essa AA, Tsega WK. Advanced abdominal pregnancy, with live fetus and severe preeclampsia, case report. BMC Pregnancy Childbirth. 2017;17(1):243.

Harding HP, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol Cell. 2003;11(3):619-33.

Hecht JL, et al. Revisiting decidual vasculopathy. Placenta. 2016;42:37–43.

Hibbard BM. Principles of obstetrics. Boston: Butterworths. 1988.

Hiby SE, et al. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2 [published correction appears in J Clin Invest. 2011 Jan 4;121(1):455. Redman, Christopher C [corrected to Redman, Christopher W]]. J Clin Invest. 2010;120(11):4102-4110.

Hiby SE, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. J Exp Med. 2004;200(8):957–965.

Hitomi J, et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress induced apoptosis and Abeta-induced cell death. J Cell Biol. 2004.10;165(3):347-56.

Holohan C, et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nat Rev Cancer. 2013 Oct;13(10):714–26.

Hool LC, Corry B. Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal. 2007;9(4):409-35.

Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. Taiwan J Obstet Gynecol. 2006;45(3):189-200.

Hung TH, et al. Mammalian target of rapamycin signaling is a mechanistic link between increased endoplasmic reticulum stress and autophagy in the placentas of pregnancies complicated by growth restriction. Placenta. 2017;60:9–20.

Huppertz B. Maternal-fetal interactions, predictive markers for preeclampsia, and programming. J Reprod Immunol. 2015:26–32.

Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. Hypertension. 2008; 51:970–5.

Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2011;25(4):391–403.

Iglesias-Platas I, et al. STOX1 is not imprinted and is not likely to be involved in preeclampsia. Nat Genet. 2007; 39:279–280.

Iwawaki T, et al. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(39):16657–16662.

Jaffe R, Jauniaux E, Hustin J. Maternal circulation in the first-trimester human placenta—myth or reality? Am J Obstet Gynecol. 1997;176(3):695–705.

Jain A, et al. Endothelin-1 induces endoplasmic reticulum stress by activating the PLC-IP(3) pathway: implications for placental pathophysiology in preeclampsia. Am J Pathol. 2012;180(6):2309–2320.

James JL, Stone PR, Chamley LW. Cytotrophoblast differentiation in the first trimester of pregnancy: evidence for separate progenitors of extravillous trophoblasts and syncytiotrophoblast. Reproduction. 2005 Jul;130(1):95-103.

Johns R. Observations of puerperal convulsions. Dublin Journal of Medical Science. 1843; 24(1):101– 115.

Johnsen GM, et al. The combination of maternal KIR-B and fetal HLA-C2 is associated with decidua basalis acute atherosis in pregnancies with preeclampsia. J Reprod Immunol. 2018;129:23–29.

Jones CJ, Fox H. An ultrastructural and ultrahistochemical study of the human placenta in maternal pre-eclampsia. Placenta. 1980;1(1):61-76.

Kang H, et al. Transcript analyses of stromal cell derived factors (SDFs): SDF-2, SDF-4 and SDF-5 reveal a different pattern of expression and prognostic association in human breast cancer. Int J Oncol. 2009;35(1):205-11.

Kaufman RJ, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(6):411-21.

Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. Biol Reprod. 2003;69(1):1-7.

Kaufmann P. Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta. Contrib Gynecol Obstet. 1985;13:5-17.

Kawakami T, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress alters placental morphology and causes low birth weight. Toxicol Appl Pharmacol. 2014;275(2):134–144.

Khan MM, Yang WL, Wang P. Endoplasmic reticulum stress in sepsis. Shock. 2015;44(4):294–304.

Kim HS, et al. Effect of propofol on calcium homeostasis in hypoxia-reoxygenated neonatal rat cardiomyocytes. Eur J Pharmacol. 2008;594(1-3):139-145.

King A, Thomas L, Bischof P. Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report. Placenta. 2000;21 Suppl A:S113-S119.

Kivinen K, et al. Evaluation of STOX1 as a preeclampsia candidate gene in a population-wide sample. Eur J Hum Genet. 2007;15(4):494-497.

Kovo M, et al. Pregnancy outcome and placental findings in pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without preeclampsia. Reprod Sci. 2015;22(3):316-321.

Kondareddy T, Prathap T. Uric acid as an important biomarker in hypertensive disorders in pregnancy. nt J Reprod Contracept Obstet Gynecol. 2016 Dec;5(12):4382-4384

Lala PK, Nandi P. Mechanisms of trophoblast migration, endometrial angiogenesis in preeclampsia: the role of decorin. Cell Adh Migr. 2016;10 (1-2):111–25.

Lamminpää R, et al. Preeclampsia complicated by advanced maternal age: a registry-based study on primiparous women in Finland 1997-2008. BMC Pregnancy Childbirth. 2012;12:47.

Law KP, et al. Mass spectrometry-based proteomics for pre-eclampsia and preterm birth. Int J Mol Sci. 2015 May 14;16(5):10952-85.

Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods. 2005;35(4):373–381.

Lee SJ, Lee IK, Jeon JH. Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism. Int J Mol Sci. 2020;21(8):E2685.

Levine RJ, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. N Engl J Med. 2006;355:992–1005.

Levine RJ, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. N Engl J Med. 2004;350:672– 683.

Li DK, Wi S. Changing paternity and the risk of preeclampsia/eclampsia in the subsequent pregnancy. Am J Epidemiol. 2000;151(1):57–62.

Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. J Biol Chem. 2006;281(11):7260-7270.

Li J, et al. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. Cell Death Differ. 2008; 15(9):1460-71.

Li X, et al. Preterm birth, low birthweight, and small for gestational age among women with preeclampsia: Does maternal age matter?. Pregnancy Hypertens. 2018;13:260–266.

Lian IA, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. Placenta. 2011;32(11):823-9.

Lievremont, JP, et al. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca2+. J. Biol. Chem. 1997, 272, 30873–30879.

Liu AX, et al. Sustained endoplasmic reticulum stress as a cofactor of oxidative stress in decidual cells from patients with early pregnancy loss. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(3):E493-7.

Lopez-Jaramillo P, et al. Obesity and Preeclampsia: Common Pathophysiological Mechanisms. Front Physiol. 2018;9:1838.

Lorenzon-Ojea AR, et al. Stromal cell derived factor-2 (Sdf2): A novel protein expressed in mouse. Int J Biochem Cell Biol. 2014;53:262-70.

Lorenzon-Ojea AR, et al. Stromal Cell-Derived Factor 2: A Novel Protein that Interferes in Endoplasmic Reticulum Stress Pathway in Human Placental Cells. Biol Reprod. 2016;95(2):41.

Lorenzon AR, et al. Stromal Cell-Derived Factor (SDF) 2 and the Endoplasmic Reticulum Stress Response of Trophoblast Cells in Gestational Diabetes Mellitus and In vitroHyperglycaemic Condition. Curr Vasc Pharmacol. 2021;19(2):201-209.

Lorenzon-Ojea AR, et al. The potential contribution of stromal cell-derived factor 2 (SDF2) in endoplasmic reticulum stress response in severe preeclampsia and labor-onset. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020;1866(2):165386.

Lorenzon-Ojea AR. Expressão e possível função do Fator 2 derivado de células estromais (SDF2) na gestação. [Tese] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Lučovnik M, et al. Hypertensive disorders during monozygotic and dizygotic twin gestations: A population-based study. Hypertens Pregnancy. 2016;35(4):542-547.

Malmström O, Morken NH. HELLP syndrome, risk factors in first and second pregnancy: a population-based cohort study. Acta Obstet Gynecol Scand. 2018;97(6):709–716.

Marciniak SJ, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. Genes Dev. 2004;18(24):3066–3077.

Martin AC, Brown MA. Could uric acid have a pathogenic role in pre-eclampsia?. Nat Rev Nephrol. 2010; 6(12):744–748.

Masoura S, et al. The involvement of uric acid in the pathogenesis of preeclampsia. Curr Hypertens Rev. 2015;11(2):110-115.

Mathur P, et al. A Prospective Study of Placental Growth Factor Assay as a Novel Biomarker in Predicting Early-Onset Preeclampsia in High-Risk Patients. J Obstet Gynaecol India. 2016;66(Suppl 1):98-103.

Maynard SE, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J Clin Invest. 2003;111(5):649–658.

McCullough KD, et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. Mol Cell Biol. 2001;21(4):1249-1259.

Melamed N, et al. Risk for recurrence of preeclampsia and outcome of subsequent pregnancy in women with preeclampsia in their first pregnancy. J Matern Fetal Neonatal Med. 2012;25(11):2248–2251.

Mochan S, et al. Status of VEGF in preeclampsia and its effect on endoplasmic reticulum stress in placental trophoblast cells. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X. 2019;4:100070.

Monte S. Biochemical markers for prediction of preclampsia: review of the literature. J Prenat Med. 2011;5(3):69–77.

Morris NH, Eaton BM, Dekker G. Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol. 1996;103(1):4–15.

Morton JS, Care AS, Davidge ST. Mechanisms of Uterine Artery Dysfunction in Pregnancy Complications. J Cardiovasc Pharmacol. 2017;69(6):343-359.

Myatt L, et al. Strategy for standardization of preeclampsia research study design. Hypertension. 2014;63(6):1293-301.

Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. Biochem J. 2011;434(2):181–188.

NICE. National Institute for Health and Care Excellence. Clinical Guidance. PlGF-based testing to help diagnose suspected pre-eclampsia (Triage PlGF test, Elecsys immunoassay sFlt-1/PlGF ratio, DELFIA Xpress PlGF 1-2-3 test, and BRAHMS sFlt-1 Kryptor/BRAHMS PlGF plus Kryptor PE ratio)2016.

Nilsson E, et al. The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. BJOG. 2004;111:200–6.

O'Brien M, Baczyk D, Kingdom JC. Endothelial Dysfunction in Severe Preeclampsia is Mediated by Soluble Factors, Rather than Extracellular Vesicles. Sci Rep. 2017;7(1):5887.

Osol G, Ko NL, Mandalà M. Altered Endothelial Nitric Oxide Signaling as a Paradigm for Maternal Vascular Maladaptation in Preeclampsia. Curr Hypertens Rep. 2017;19(10):82.

Palam LR, Baird TD, Wek RC. Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. J Biol Chem. 2011;286(13):10939-10949.

Pällmann N, et al. Regulation of the unfolded protein response through ATF4 and FAM129A in prostate cancer. Oncogene. 2019;38(35):6301-6318.

Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. Nat Rev Immunol. 2005; 5:201–214.

Parham P. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. J Exp Med. 2004;200(8):951–955.

Park JE, et al. Placenta growth factor: potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. J Biol Chem. 1994;269:25646 –25654.

Perales A, et al. sFlt-1/PlGF for prediction of early-onset pre-eclampsia: STEPS (Study of Early Pre-eclampsia in Spain). Ultrasound Obstet Gynecol. 2017;50(3):373-382.

Phipps EA, et al. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies [published correction appears in Nat Rev Nephrol. 2019 Jun;15(6):386]. Nat Rev Nephrol. 2019;15(5):275-289.

Pijnenborg R, et al. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. Placenta. 1983; 4(4):397-413.

Poon LC, et al. Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach. J Hum Hypertens. 2010;24(2):104-110.

Possomato-Vieira JS, Khalil RA. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. Adv Pharmacol. 2016;77:361-431.

Poston L, McCarthy AL, Ritter JM. Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. Pharmacol Ther. 1995;65(2):215-239.

Prado, KM. O efeito do microambiente no comportamento placentário: resposta das vilosidades coriônicas ao soro materno saudável e pré-eclâmptico [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019

Puthalakath H, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. Cell. 2007;129(7):1337-49.

Qingdong K, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Mol Pharmacol. 2006; 70:1469–1480.

Queiroz, MR. Síndromes hipertensivas na gestação no Brasil: estudo a partir dos dados da pesquisa "Nascer no Brasil [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2018

Rajakumar A, et al. Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. Placenta. 2004;25(10):763–769.

Ramos J, Sass N, Costa S. Pré-eclâmpsia nos seus diversos aspectos: Série Orientações e Recomendações. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. São Paulo: FEBRASGO; 2017. 56 p. v. 8.

Rana S, et al. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. Circulation. 2012;125(7):911–919.

Rao H, et al. SATB1 downregulation induced by oxidative stress participates in trophoblast invasion by regulating β-catenin. Biol Reprod. 2018;98(6):810-820.

Rao RV,et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. J Biol Chem. 2002; 277 (24): 21836-42.

Rätsep MT, et al. Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. Reproduction. 2015;149(2):R91–R102.

Reddy RK, et al. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. J Biol Chem. 2003;278(23):20915-20924.

Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2010;63(6):534-543.

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Science. 2005;308:1592–4.

Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. Placenta. 2003;Suppl A:S21-7.

Redman CW. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. Placenta. 1991;12(4):301-308.

Redman CWG, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. Placenta. 2000;21:597–602.

Rigourd V, et al. STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. PLoS One. 2008;3(12):e3905.

Riteau B, et al. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. J Reprod Immunol. 1999;43(2):203-211.

Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. Pregnancy Hypertens. 2012;2:72–83.

Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. Placenta. 2009;30: Suppl A:S32-7.

Robertson SA, Bromfield JJ, Tremellen KP. Seminal 'priming' for protection from pre-eclampsia-a unifying hypothesis. J Reprod Immunol. 2003;59(2):253-265.

Robertson SA, et al. Transforming growth factor beta–a mediator of immune deviation in seminal plasma. Journal of Reproductive Immunology 2002; 57:109–128.

Robertson WB, Brosens I, Dixon HG. The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. J Pathol Bacteriol. 1967;93(2):581–592.

Robinson NJ, et al. Oxygen and the liberation of placental factors responsible for vascular compromise. Lab Invest. 2008;88(3):293-305.

Romero R, Chaiworapongsa T. Preeclampsia: a link between trophoblast dysregulation and an antiangiogenic state. J Clin Invest. 2013;123:2775– 2777.

Romero R, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. J Matern Fetal Neonatal Med. 2008 Jan;21(1):9-23.

Rozpedek W, et al. The Role of the PERK/eIF2α/ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. Curr Mol Med. 2016;16(6):533-44.

Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. Trends Cell Biol. 2004;14(1):20-28.

Sankaralingam S, et al. Preeclampsia: current understanding of the molecular basis of vascular dysfunction. Expert Rev Mol Med. 2006;8(3):1-20.

Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. Biochim Biophys Acta. 2013;1833(12):3460-3470.

Sarno L, et al. Pregnancy outcome in proteinuria-onset and hypertension-onset preeclampsia. Hypertens Pregnancy. 2015;34(3):284-290.

Sato M, et al. GRP78 signaling hub a receptor for targeted tumor therapy. Adv Genet. 2010;69:97–114.

Savvidou MD, et al. Twin chorionicity and pre-eclampsia. Ultrasound Obstet Gynecol.2001;18: 228–231.

Schindler AJ, Schekman R. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(42):17775-80.

Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. Mutat Res. 2005;569(1-2):29-63.

Scriven P, et al. Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer. Br J Cancer. 2009;101(10):1692–1698.

Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. Trends Biochem Sci. 2015;40(3):141–148.

Seremak-Mrozikiewicz A, et al. The significance of genetic polymorphisms of factor V Leiden and prothrombin in the preeclamptic Polish women. J Thromb Thrombolysis. 2010;30(1):97–104.

Serrano NC, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and preeclampsia risk: evidence of small-study bias. PLoS Med. 2006;3(12):e520.

Sharkey AM, et al. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. J Reprod Fertil. 1993;99(2):609-15.

Sheen JJ, et al. Maternal Age and Preeclampsia Outcomes during Delivery Hospitalizations. Am J Perinatol. 2020;37(1):44–52.

Shi Z, et al. Overexpression of calreticulin in pre-eclamptic placentas: effect on apoptosis, cell invasion and severity of pre-eclampsia. Cell Biochem Biophys. 2012;63(2):183–189.

Shiozaki A, Saito S. Risk Factors for Preeclampsia. Comprehensive Gynecology and Obstetrics. 2018:3–25.

Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. Lancet. 2005;365:785–99.

Sibai BM. Chronic hypertension in pregnancy. Obstet Gynecol. 2002;100(2):369–77.

Singh A, et al. Role of inflammatory cytokines and eNOS gene polymorphism in pathophysiology of pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2010;63(3):244–251.

Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT. The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. N Engl J Med. 2002;346(1):33-38.

Smarason AK, et al. The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro. Br J Obstet Gynaecol. 1993;100:943–9.

Sohlberg S, et l. Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: a magnetic resonance imaging study. Placenta. 2014;35(3):202-206.

Spinillo A, et al. Pathologic placental lesions in early and late fetal growth restriction. Acta Obstet Gynecol Scand. 2019;98(12):1585–1594.

Spradley FT, Palei AC, Granger JP. Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;309(11):R1326-R1343.

Staff AC, et al. Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. Hypertension. 2013;61(5):932–942.

Stepan H, et al. Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice. Ultrasound Obstet Gynecol. 2015;45(3):241-246.

Sullivan JM. Hypertension in pregnancy. Clin Perinatol. 1974;1(2):369–384.

Sultana R, et al. Association of serum uric acid with preeclampsia: a case control study. Delta Med Coll J. 2013;1(2):46–50.

Tam AB, Mercado EL, Hoffmann A, Niwa M. ER stress activates NF-κB by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. PLoS One. 2012;7(10):e45078.

Tarrade A, , et al. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. Lab Invest. 2001;81(9):1199-1211.

Tomas SZ, et al. Trophoblast apoptosis in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. Gynecol Obstet Invest. 2011;71(4):250-255.

Tomimatsu T, et al. Pathophysiology of preeclampsia: an angiogenic imbalance and long-lasting systemic vascular dysfunction. Hypertens Res. 2017;40(4):305–310.

Tomimatsu T, et al. Preeclampsia: Maternal Systemic Vascular Disorder Caused by Generalized Endothelial Dysfunction Due to Placental Antiangiogenic Factors. Int J Mol Sci. 2019;20(17):4246.

Tranquilli AL, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. Pregnancy Hypertens. 2014;4(2):97–104.

Uramoto H, et al. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance. Lung Cancer. 2005l; 49(1):55-62.

Venkatesha S, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia [published correction appears in Nat Med. 2006;12(7):862]. Nat Med. 2006;12(6):642–649.

Verlohren S, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2010;202(2):161.e1-161.e11.

Verlohren S, et al. New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. Hypertension. 2014;63:346-352.

Verma S, et al. Placental hypoxia inducible factor -1α & CHOP immuno-histochemical expression relative to maternal circulatory syncytiotrophoblast micro-vesicles in preeclamptic and normotensive pregnancies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2018;220:18–24.

Verzola D, et al. Uric acid promotes apoptosis in human proximal tubule cells by oxidative stress and the activation of NADPH oxidase NOX 4. PLoS One. 2014;9(12):e115210.

Walker JJ. Pre-eclampsia. Lancet. 2000;356(9237):1260–1265.

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. Science. 2011;334(6059):1081-6.

Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. Physiology (Bethesda). 2009;24:147-158.

Wang Z, et al. Cadmium-induced teratogenicity: association with ROS-mediated endoplasmic reticulum stress in placenta. Toxicol Appl Pharmacol. 2012;259:236–247

Wolf M, et al. First trimester insulin resistance and subsequent preeclampsia: a prospective study. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(4):1563-1568.

Wortel IMN, et al. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. Trends Endocrinol Metab. 2017;28(11):794–806.

Wright D, et al. Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal characteristics and medical history. Am J Obstet Gynecol. 2015;213(1):62.e1–62.e10.

Wynn RM. Fetomaternal cellular relations in the human basal plate: an ultrastructural study of the placenta. Am J Obstet Gynecol. 1967;97(6):832-850.

Xiong X, et al. Impact of preeclampsia and gestational hypertension on birth weight by gestational age. Am J Epidemiol. 2002;155:203–9

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. J Clin Invest. 2005;115(10):2656-64.

Xue X, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. J Biol Chem. 2005;280(40):33917-25.

Yalcin A, Hotamisligil GS. Impact of ER protein homeostasis on metabolism. Diabetes. 2013;62(3):691–693.

Yang ES, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress response in orofacial inflammatory pain. Exp Neurobiol. 2014;23(4):372–380.

Yang Y, et al. The roles of endoplasmic reticulum stress response in female mammalian reproduction. Cell Tissue Res. 2016;363(3):589–597.

Yoneda N, et al. A triploid partial mole placenta from paternal isodisomy with a diploid fetus derived from one sperm and one oocyte may have caused angiogenic imbalance leading to preeclampsia-like symptoms at 19 weeks of gestation. Placenta. 2013;34:631–4.

Yoshida H, et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell. 2001;107(7):881-91.

Yoshida H. ER stress and diseases. FEBS J. 2007 Feb;274(3):630-58.

Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. Annu Rev Pathol. 2010;5:173–192.

Yung HW, et al. Placental endoplasmic reticulum stress in gestational diabetes: the potential for therapeutic intervention with chemical chaperones and antioxidants. Diabetologia. 2016;59(10):2240–2250.

Yung HW, et al. Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. J Pathol. 2014;234(2):262–276.

Yung HW, et al. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. Am J Pathol. 2008;173(2):451–462.

Yung HW, et al. Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction. J Pathol. 2012;228(4):554–564.

Zeisler H,et al. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. N Engl J Med. 2016;374:13-22.

Zhang J, et al. To serve and to protect: the role of decidual innate immune cells on human pregnancy. Cell Tissue Res. 2016;363(1):249-265.

Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. Nature. 2008;454:455–62.

Zhao X, Frempong ST, Duan T. Uric acid levels in gestational hypertensive women predict preeclampsia and outcome of small-for-gestational-age infants. J Matern Fetal Neonatal Med. 2019;1-7.

Zinszner H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes Dev. 1998;12(7):982-995.