

KAREN MATIAS DO PRADO

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

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

Área de concentração:
Biologia Celular, Tecidual e do
Desenvolvimento

Orientadora:
Profa. Dra. Estela Bevilacqua

Versão original

São Paulo
2019

RESUMO

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

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

Métodos: Fragmentos da porção fetal (explantes) de placentas a termo (terceiro trimestre) de gestantes saudáveis e pré-eclâmpticas (PE) foram tratados com soro materno pré-eclâmptico e saudável durante 24 horas, a 37°C, em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Foi analisado nas amostras: a atividade metabólica por meio de ensaios de MTT, produção de citocinas (por ELISA: IL-12, IL-6, IL-8, IL-1β, TNF-α e IL-10), e a expressão gênica (por RT-qPCR) e protéica (por ELISA e Western blot) de sFlt-1 e PlGF.

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

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

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

ABSTRACT

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

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

Methods: Fragments of the fetal portion (explants) of term placentas (third trimester) of healthy and preeclamptic (PE) pregnant women were treated with healthy and pre-eclamptic maternal serum for 24 hours at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂. Metabolic activity was assessed by MTT assays, cytokine production by ELISA (IL-12, IL-6, IL-8, IL-1β, TNF-α, and IL-10), and gene and protein expression of sFlt-1 and PlGF by RT-qPCR and ELISA and Western blot, respectively.

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

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

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

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

8. CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitiram concluir que:

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BRIDGES, J. P.; GILBERT, J. S.; COLSON, D.; et al. Oxidative stress contributes to soluble fms-like tyrosine kinase-1 induced vascular dysfunction in pregnant rats. **Am J Hypertens**. v.22. n.5. p.564–568. 2009.

BROSENS, I. A.; ROBERTSON, W. B.; DIXON, H. G. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. **Obstet Gynecol Annu**. n.1, p.177-91, 1972.

BURTON, G. J.; JONES, C. J. Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta. **Taiwan J Obstet Gynecol** v.48. n.1. p.28–37. 2009.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. The cytotrophoblastic shell and complications of pregnancy. **Placenta**. n.60, p.134–9, 2017.

CANIGGIA, I.; WINTER, J.; LYE, S. J. et al. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. **Placenta**. n.21, p.25-30, 2000.

CARNEY, E. F. Epigenetics: Disturbed imprinting in pre-eclampsia. **Nat Rev Nephrol**. v.13. n.11. p.663. 2017

CARTWRIGHT, J. E.; WILLIAMS, P. J. Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in pre-eclampsia. **J Endocrinol**. n.1, p.79-85, 2012.

CONDE-AGUDELO, A.; VILLAR, J.; LINDHEIMER, M. World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia. **Obstet Gynecol**. v.104, n.6, p.1367-91, 2004.

CINCOTTA, R. B.; BRENNECKE, S. P. Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. **Int J Gynaecol Obstet**. v.60. n.1. p.23-7. 1998.

COSTA, R. A.; HOSHIDA, M. S.; ALVES, E. A.; ZUGAIB, M.; FRANCISCO, R. P. Preeclampsia and superimposed preeclampsia: The same disease? The role of angiogenic biomarkers. **Hypertens Pregnancy**. v.35. n.2. p.139-49. 2016.

DANEVA, A. M.; HADŽI-LEGA, M.; STEFANOVIC, M. Correlation of the system of cytokines in moderate and severe preeclampsia. **Clin Exp Obstet Gynecol**; v.43. p.220-224. 2016.

Di FEDERICO, E.; GENBACEV, O.; FISHER, S. J. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. **Am J Pathol**. v.155, n.1, p.293-301, 1999.

DRAGAN, I.; GEORGIU, T.; PRODAN, N.; AKOLEKAR, R.; NICOLAIDES, K. H.; Screening for pre-eclampsia using sFlt-1/PIGF ratio cut-off of 38 at 30-37 weeks' gestation. **Ultrasound Obstet Gynecol**. v.49. n.1. p.73-77. 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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