

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Dissertação de Mestrado

SARAH VIANA MATTIOLI

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS VIAS DE DISFUNÇÃO  
ENDOTELIAL ASSOCIADAS À PRÉ-ECLÂMPsia**

**BOTUCATU – SP**

**2023**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Identificação de Novas Vias de Disfunção Endotelial Associadas  
à Pré-eclâmpsia

**SARAH VIANA MATTIOLI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

*Orientadora: Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim*  
*Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger*

**BOTUCATU – SP**

**2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mattioli, Sarah Viana.

Identificação de novas vias de disfunção endotelial associadas à pré-eclâmpsia / Sarah Viana Mattioli. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Valéria Cristina Sandrim

Coorientador: José Eduardo Krieger

Capes: 90300009

1. Pré-eclâmpsia. 2. Hipertensão induzida pela gravidez. 3. Morbidade. 4. Mães - Mortalidade. 5. Estresse oxidativo.

Palavras-chave: Disfunção endotelial; Hipertensão gestacional; Pré-eclâmpsia; Shear stress.

# Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha avó(-mãe). Não caberiam nessas linhas o quanto sou grata a você. Obrigada por sempre me apoiar e guiar ao longo de toda a minha vida. Esse trabalho não existiria sem o seu apoio incondicional durante toda a minha jornada. Amo você.

# Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha orientadora Prof. Dra. Valéria Cristina Sandrim, por ser mais do que uma orientadora, mas grande mentora e amiga. Sou grata pela oportunidade de acompanhar e colaborar com a linha de pesquisa que você ergueu. Obrigada por toda compreensão, paciência e apoio frente minhas limitações e por sempre acreditar e confiar no meu potencial, mesmo em momentos quando eu mesma duvidei. Tem sido um privilégio estar sobre a sua orientação e ver de perto a dedicação e amor que você tem, não só pela vida e pela ciência como um todo, mas pela ciência feita por mulheres para mulheres. Essa dedicação é algo lindo de se ver e é parte significativa do que me fez chegar até aqui com meu trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, meu coorientador, com quem aprendi muito sobre pensamento científico durante nossas enriquecedoras discussões. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório, um lugar incrível em que se respira ciência, e por me incentivar a aprofundar cada vez mais meus conhecimentos.

Agradeço ao Dr. Ricardo Cavalli, por gentilmente ceder amostras e seus conhecimentos clínicos sempre com prontidão. Obrigada pela oportunidade de colaboração.

Agradeço de todo o meu coração aos meus avós, Herbene e José. Sei que vocês batalharam muito ao longo da vida para cuidar dos filhos e mais ainda para superar uma perda tão dolorida e me criar como mais uma filha com tanto amor e carinho. Toda a minha dedicação e persistência é para um dia poder retribuir tudo o que vocês fizeram por mim. Eu amo vocês mais que tudo, vocês são meu tesouro.

À Miriam Alaniz, Iguaracy Sousa e Ricardo Rosa, a família científica que me acolheu “fora de casa”. Cada parte dessa pesquisa tem a contribuição de pelo menos um de vocês e não existiria sem esse apoio. Obrigada por todo o aprendizado e discussões sobre ciência, mas também pelos conselhos, papo furado e risadas partilhadas. Vocês tiveram papel fundamental nessa pesquisa e no meu desenvolvimento pessoal desses últimos anos.

Agradeço à toda a minha família pelo apoio e carinho que me dedicaram. Em especial aos meus tios, Alessandro, Edna, Monise e Paulo e minha mãe Marcia, que mesmo de longe sempre se preocuparam comigo e me deram apoio. Aos meus queridos “Monjoleiros”, por todas as risadas, aventuras e palavras de carinho e de apoio partilhadas, em especial meus tios Helio e Helcio, meus queridos companheiros de prosa e conselhos. Minha querida tia-avó Tereza, que junto ao meu querido tio Elvécio (*in memoriam*) sempre viu a beleza no caminho acadêmico que escolhi seguir e foi uma das minhas maiores incentivadoras nessa jornada.

Agradeço às minhas companheiras, mais antigas e mais recentes, do Sandrim Lab, Naiara, Thainá, Mariana, Priscilla e Caroline, e a todos os queridos amigos, funcionários e professores do departamento de Farmacologia, pela amizade, apoio, disponibilidade, respeito e companheirismo. Em especial às minhas amigas Naiara, Ediléia, Noêmia, Thainá e Mariana. Mesmo que nossa convivência tenha reduzido eu sinto que nada mudou, eu vou sempre ser imensamente grata pela amizade de vocês e sinto muita alegria por ver cada conquista, pessoal ou acadêmica, de vocês. Vocês me inspiram. Aos professores Dr. Erick e Dr. Carlos pelos valiosos conselhos e toda a gentileza e suporte. Aos queridos Cris, “Paulão” e Hélio, por todo o apoio ao longo desses anos.

Agradeço também ao corpo técnico do LGCM. Obrigada por me receberem de braços abertos e por todo o apoio e carinho nesses últimos anos. Em especial, às doces Ana Piesco e Ednalva, que sempre me apoiam e alegam meu dia. À Miriam Alaniz, Mariana Carvalho, Élide Neri, Ayumi Miyakawa, Samantha Teixeira e Mariliza Rodrigues, por me permitirem aprender tanto com vocês e todo o auxílio na parte experimental. Agradeço também aos amigos incríveis que fiz no laboratório. Em especial, aos meus companheiros de todos os dias, Caio e Mari, com quem aprendi tanto sobre ciência e partilhei diversas risadas e comidinhas gostosas nos últimos meses. Admiro muito vocês como profissionais e sou extremamente grata por sua amizade. Vocês alegam meus dias. Meus amigos de “cafezinho”, Fabio, Iguaracy, Luis e Leticia, com quem partilhei conversas filosóficas, risadas e, por fim, mas não menos importante, café. Meus colegas da bioinformática, Guilherme, Ricardo e Ester, que sempre são imensamente gentis em me conceder ajuda com a parte de programação.

Agradeço aos meus melhores amigos Gabriel e Ivan, companheiros de turma e dessa vida acadêmica. Obrigada por sempre me guiarem, por me fazerem rir nos bons e maus momentos, pelas caronas e aventuras partilhadas e por sempre cuidarem de mim. Também gostaria de agradecer aos meus amigos de longa data Barbara, Maria Eugenia, Maria Luiza, Matheus e Vera, por sempre estarem comigo ao longo de tantos anos sempre me incentivando e celebrando cada pequena conquista. Vocês são a família que eu escolhi.

Por fim, agradeço à seção técnica da Pós-Graduação, ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil, 88887.604855/2021-00), além do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil, 308504/2021-6, and 408426/2021-7) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/Brasil, 2019/07230-8 and 2021/12010-7).

Cada um de vocês colaborou de forma única para que essa dissertação, seja de forma direta ou indireta e por isso agradeço de todo o meu coração.

# Epígrafe

*“At present I absolutely want to paint a starry sky. It often seems to me that night is still more richly colored than the day; having hues of the most intense violets, blues and greens. If only you pay attention to it, you will see that certain stars are lemon-yellow, others pink or a green, blue and forget-me-not brilliance. And without my expatiating on this theme, it is obvious that putting little white dots on the blue-black is not enough to paint a starry sky.”*

*-Vincent Van Gogh*

# Resumo

A pré-eclâmpsia (PE), uma das principais síndromes hipertensivas da gravidez, está associada a elevados níveis de morbidade e mortalidade materna-fetal, e sua causa permanece desconhecida. A disfunção endotelial (DE) materna, está associada a fatores circulantes libertados pela placenta isquêmica na circulação, mas a sua avaliação depende da recapitulação de forças físicas tais como diferentes padrões de stress de cisalhamento (SS, do inglês shear stress) que afetam a função e disfunção do endotélio. Estudos prévios avaliaram a incubação *in vitro* de células endoteliais com plasma de pacientes com PE, mas sem ter em conta os diferentes padrões de SS. Para preencher esta lacuna da literatura, desenvolvemos um estudo para avaliar os efeitos do plasma de pacientes com PE, hipertensão gestacional (GH) e do plasma de gestantes saudáveis (HP) sobre a função das células endoteliais sob shear stress laminar (LSS) e oscilatório (OSS). Nós avaliamos as alterações nas vias celulares enriquecidas na análise global do perfil de expressão genica destas células expostas às amostras de plasma de PE, GH e HP sob as duas condições SS, em comparação com um grupo controle sem tratamento com plasma (CT). Os nossos dados indicaram que existe uma dependência dos padrões de SS nos efeitos causados pelos três tratamentos de plasma na modulação das vias celulares avaliadas pelo transcriptoma global em células endoteliais coronárias humanas (HCAECs). Sob LSS, todos os tratamentos diferem, e observamos a diferença entre os grupos de PE e GH. Houve também diferenças entre os grupos associados à hipertensão e HP. Sob OSS, o transcriptoma da células tratadas com plasma de PE e GH apresentam um perfil muito semelhante com relação ao tratamento com plasma de HP. Sob LSS, a exposição ao PE plasmático resultou principalmente na ativação de genes associados à resposta inflamatória, stress do retículo endoplasmático e transição endotelial para mesenquimal (EndMT). Sob OSS, as HCAEC expostas aos três tratamentos plasmáticos tinham um perfil de expressão de genes muito semelhante com algumas ocorrências raras que poderiam indicar que os plasmas de PE e GH poderiam ter um nível de DE aumentado, como níveis aumentados de expressão de *IL1B*. As vias associadas à DE também apresentaram valores de p ajustados e odds ratio mais elevados do que os outros dois tratamentos de plasma para EndMT e TNF- $\alpha$  sinalização através de NF- $\kappa$ B, indicando que o plasma de PE poderia exacerbar estes processos mais do que os outros dois tratamentos no OSS. Em geral, os nossos dados salientam a importância das vias dependentes de SS na gênese e manutenção da DE, com efeitos particularmente pronunciados nos HCAECs tratados com plasma de PE.

**Palavras-chave:** disfunção endotelial; pré-eclâmpsia; hipertensão gestacional; *shear stress*.



# Abstract

Preeclampsia (PE) is one of the main pregnancy-specific hypertensive disorders, it is associated with high maternal morbidity and mortality, but whose causes remain unknown. Endothelial dysfunction (ED), associated with circulating factors released by the ischemic placenta, is a potential pathogenic mechanism, but its assessment depends on the recapitulation of physical forces such as different patterns of shear stress (SS) that affect circulation differently. There is evidence from studies that evaluated the *in vitro* incubation of endothelial cells with plasma from patients with PE, but without taking into account the different patterns of SS. Therefore, we developed a study to evaluate the effects of PE, gestational hypertension (GH) and healthy pregnant (HP) patients' plasma on endothelial cell function under laminar (LSS) and oscillatory (OSS) shear stress, respectively. We deduced the changes in cellular pathways enriched in these responses from the global analysis of the gene expression profile of these cells exposed to the PE and GH plasma samples under the two SS conditions compared to a control group without plasma treatment (CT). Our data indicated that there is a dependence of SS patterns on the effects caused by the three plasma treatments on the modulation of cellular pathways evaluated by the global transcriptome in human coronary endothelial cells (HCAECs). Under LSS, all treatments differ, and we observed the greatest difference between the PE and GH groups. There were also differences between the groups associated with hypertension disorders of pregnancy and HP. Under OSS, PE and GH transcriptomes had a much similar profile, but still kept their differences from HP transcriptome. Under LSS, exposure to plasma PE resulted mainly in the activation of genes associated with inflammatory response, endoplasmic reticulum stress and endothelial to mesenchymal transition (EndMT). Under OSS, HCAECs exposed to all three plasma treatments had a very similar gene expression profile with some rare occurrences that might indicate that PE and GH might have an increased ED level, like increased levels of *IL1B* expression. ED associated pathways had higher adjusted p values and odds ratio than the other two plasma treatments for EndMT and TNF- $\alpha$  signaling via NF- $\kappa$ B, indicating that this plasma treatment might exacerbate these processes more than the other two plasma treatments in OSS. Overall, our data highlights the importance of SS-dependent pathways in the genesis and maintenance of ED, with particularly pronounced effects in PE plasma-treated HCAECs.

**Keywords:** endothelial dysfunction; preeclampsia; gestational hypertension; shear stress.

# Sumário

<b>Introdução .....</b>	<b>2</b>
Índices de Mortalidade Materna no Mundo e no Brasil .....	2
<b>Alterações Fisiológicas do Sistema Cardiovascular Durante a Gestação.....</b>	<b>3</b>
Síndromes Hipertensivas da Gestação (SIGs) .....	4
Pré-Eclâmpsia.....	5
Fatores de risco e fisiopatologia .....	5
Similaridades e diferenças com relação à fisiopatologia da hipertensão gestacional .....	8
A (Dis)Função do Endotélio: além do óxido nítrico.....	9
<i>Espécies reativas de oxigênio e macromoléculas oxidadas</i> .....	10
<i>Inflamação</i> .....	11
<i>Shear Stress</i> .....	11
Modelos experimentais de Pré-eclâmpsia: vantagens e limitações .....	13
<b>Justificativa para esta dissertação .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>Modeling Endothelial Dysfunction in Preeclampsia: Current Understanding and Future Directions .....</b>	<b>28</b>
<b>Preeclampsia as a hypertensive disorder of pregnancy .....</b>	<b>29</b>
<b>The role of endothelial dysfunction in preeclampsia .....</b>	<b>29</b>
<b>The missing links in Preeclampsia study models .....</b>	<b>31</b>
Animal models .....	32
In vitro models.....	32
<b>Endothelial cell function and shear stress.....</b>	<b>32</b>
Laminar shear stress modulation of endothelial function .....	33
Oscillatory shear stress modulation of endothelial function.....	33
<b>Incorporating shear stress in preeclampsia research .....</b>	<b>34</b>
Available models of in vitro shear stress .....	34
Preeclampsia studies incorporating shear stress .....	35
<b>Concluding remarks and future perspectives.....</b>	<b>36</b>
<b>Author contributions .....</b>	<b>36</b>
<b>Acknowledgments and funding .....</b>	<b>36</b>
<b>References.....</b>	<b>36</b>
<b>Declaration of interests.....</b>	<b>41</b>
<b>Box 1.....</b>	<b>41</b>
Preeclampsia subtypes and risk factors .....	41

<b>Box 2</b> .....	<b>42</b>
Preeclampsia pathophysiology .....	42
<b>Glossary</b> .....	<b>43</b>
<b>Figure legend</b> .....	<b>46</b>
<b>Clinician’s corner</b> .....	<b>48</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>51</b>
<b>Methods</b> .....	<b>52</b>
Plasma samples collection.....	52
Cell culture .....	53
<i>Shear stress model</i> .....	53
<i>RNA isolation and Microarray gene expression profiling</i> .....	53
Microarray analysis and quality control .....	53
Differential expression analysis.....	53
Enrichment analysis.....	53
<b>Results</b> .....	<b>54</b>
Clinical profile of plasma samples .....	54
Validation of the endothelial cells profile and evaluation of classical SS genes .....	55
The effect of different plasma treatments on HCAECs global transcriptome .....	55
DEGs and biological pathways associated with each condition. ....	57
HP plasma treatment reduces endothelial cell proliferation in LSS. ....	58
Inflammatory response is increased in all plasma treated groups, but the increase is more consistently in PE groups under LSS. ....	58
Endoplasmic reticulum stress induced apoptosis is increased in PE plasma treated HCAECs under LSS. ....	58
Endothelial to mesenchymal transition is increased in HCAECs treated with PE plasma in LSS. ....	59
Endothelial to Mesenchymal transition phenotype is altered in all plasma treated groups when compared to CT in OSS. ....	60
.....	60
GH and PE plasma treated HCAECs present increased inflammatory response associated with IL1B and SERPIN2B expression. ....	60
<b>Discussion</b> .....	<b>62</b>
<b>References</b> .....	<b>63</b>
<b>Supplementary file</b> .....	<b>69</b>
<b>Atividades complementares</b> .....	<b>78</b>
<i>Estágio Nacional</i> .....	78
<i>Atividade em Docência</i> .....	78
<i>Artigos publicados em periódicos</i> .....	78
<i>Artigos submetidos</i> .....	78

# Lista de abreviaturas e siglas

$\mu\text{L}$	.....	Microlitro
g	.....	Gramas
mm Hg	.....	Milímetros de mercúrio
IMC	.....	Índice de Massa Corpórea
RMM	.....	Razão de Mortalidade Materna
ODS	.....	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ODM	.....	Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
SIGs	.....	Síndromes Hipertensivas da Gestação
DC	.....	Débito Cardíaco
VS	.....	Volume Sistólico
FC	.....	Frequência Cardíaca
PA	.....	Pressão Arterial
ACOG	.....	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
HP	.....	<i>Healthy Pregnant</i>
GH	.....	<i>Gestational Hypertension</i>
PE	.....	<i>Preeclampsia/Pré-eclâmpsia</i>
HELLP	.....	<i>Hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count</i>
MEC	.....	Matriz extracelular
TNF- $\alpha$	.....	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
ROS	.....	<i>Reactive Oxygen Species</i>
AT1-AAAs	.....	<i>Autoanticorpos agonistas contra o receptor-1 de angiotensina</i>
sENG	.....	<i>Soluble endoglin</i>
sFLT1	.....	<i>Soluble fms-like tyrosine kinase 1</i>
VEGF	.....	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2	.....	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
PIGF	.....	<i>Placental growth factor</i>
TGF- $\beta$ 1	.....	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
eNOS/NOS3	.....	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
NO	.....	<i>Nitric oxide</i>
oxLDL	.....	<i>Lipídios oxidados</i>
HMOX1	.....	<i>Heme oxygenase</i>
MCP-1	.....	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
ICAM1	.....	<i>Intracelular Adhesion molecule</i>
VCAM1	.....	<i>Vascular Cell-adhesion Molecule 1</i>
SELE	.....	<i>E-selectin</i>
NF- $\kappa$ B	.....	<i>Nuclear factor Kappa B</i>

KLF2/KLF4	.....	<i>Kruppel Like Factor2/4</i>
SS	.....	<i>Shear Stress</i>
LSS	.....	<i>Laminar Shear Stress</i>
OSS	.....	<i>Oscillatory Shear Stress</i>
PECAM1	.....	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
AT1R	.....	<i>Angiotensin II type 1 receptor</i>
HIF- $\alpha$	.....	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
ERK1/2/5	.....	<i>Extracellularly Regulated Kinases 1/2/5</i>
Akt	.....	<i>Protein kinase B</i>
AMPK	.....	<i>AMP-activated protein kinase</i>
IRAK2	.....	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2</i>
CHOP	.....	<i>DNA Damage Inducible Transcript 3</i>
EndMT	.....	<i>Endothelial to mesenchymal transition</i>
TIMP3	.....	<i>TIMP Metalloproteinase Inhibitor 3</i>
TGF- $\beta$	.....	<i>Transforming growth factor beta</i>
CoCl <sub>2</sub>	.....	Cloreto de cobalto
OxPAPC	.....	<i>Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine</i>
RLE	.....	<i>Relative Log Expression</i>
NUSE	.....	<i>Normalized Unscaled Standard Errors</i>
RMA	.....	<i>Robust Multi-Array Average</i>
PCA	.....	<i>Principal Component Analysis</i>
DEGs	.....	<i>Differentially Expressed Genes</i>
FDR	.....	<i>False Discovery Rate</i>
GSEA	.....	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
ORA	.....	<i>Over Representation Analysis</i>
PPI	.....	<i>Protein-Protein Interaction</i>
CO <sub>2</sub>	.....	Dióxido de carbono
HCAECs	.....	<i>Human Coronary Arteryc Endothelial Cells</i>
HUVECs	.....	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IL-1 $\beta$	.....	<i>Interleukin 1 beta</i>

# **Introdução e justificativa**

## Introdução

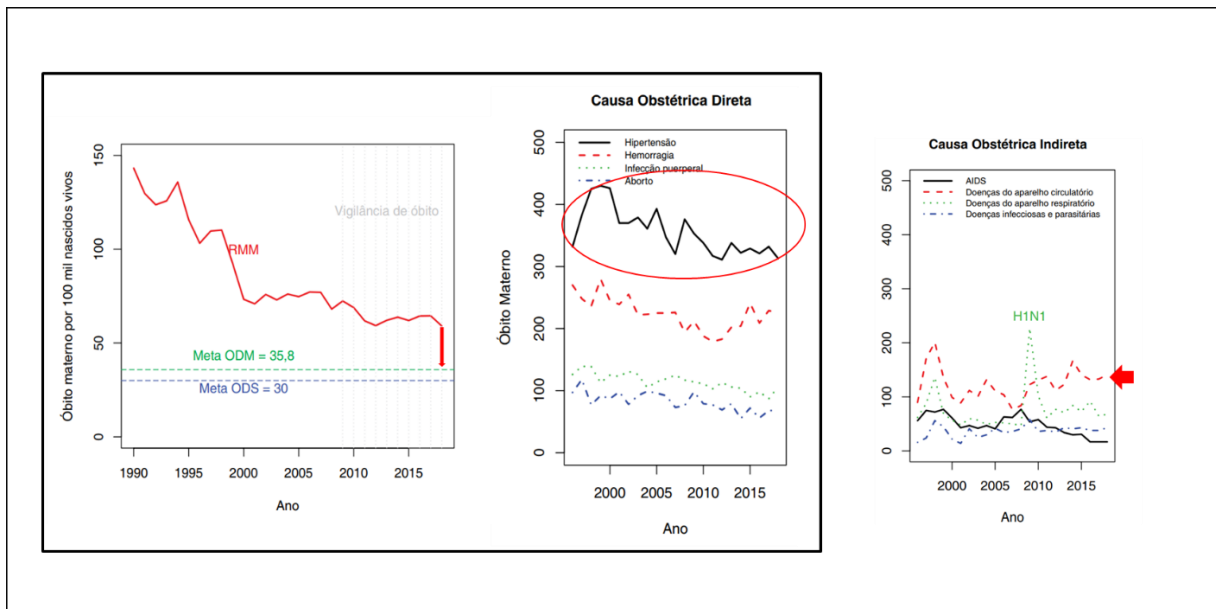
### Índices de Mortalidade Materna no Mundo e no Brasil

A razão de mortalidade materna RMM é determinada pelo número de mortes maternas para cada 100.000 nascidos-vivos durante um determinado período. Sendo consideradas mortes maternas aquelas que têm causa relacionada ou agravada pela gestação ou seu tratamento, salva a exceção de causas acidentais, durante estado gravídico (gravidez, parto ou puerpério). Um nascido-vivo conta como a separação completa do recém-nascido da mãe acompanhado de respiração ou qualquer outra evidência de vida, como batimentos cardíacos ou movimento definitivo dos músculos voluntários. O cálculo de RMM é obtido dividindo o número de mortes maternas registradas (ou estimadas) pelo total de nascidos-vivos registrados (ou estimados) no mesmo período de tempo, multiplicando por 100.000 (“Maternal mortality ratio (per 100 000 live births”))

A morte materna pode acontecer por causas diretas, quando as complicações se desenvolvem durante a gravidez, ou indiretas, com o agravamento de condições pré-existentes. Atualmente, as principais causas de mortalidade materna (~75%) no mundo incluem, em ordem de incidência: (1) quadro de hemorragia severa; (2) sindromes hipertensivas da gestação (SIGs); (3) infecção e/ou sepse; (4) complicações durante o parto; (5) aborto ilegal (SAY et al., 2014).

Somente no ano de 2017, mais de 295 000 mulheres perderam suas vidas durante ou após a gestação. A RMM mundial é inadmissivelmente elevada e ocorre, em grande maioria (94%), em áreas de poucos recursos econômicos, sendo que a maioria dessas mortes são evitáveis. Com isso em mente, desde 2015, foi estabelecido, dentro da lista de 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), a meta de redução da RMM global para menos de 70 mortes para cada 100.000 nascidos vivos até 2030. Essa, na verdade, é uma extensão do prazo dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM), que teve seu início no ano 2000 e tinha prazo final para o ano de 2015 (UNFPA et al., 2019).

No Brasil, segundo o boletim epidemiológico nº 20 do Ministério da Saúde, houve redução da RMM desde 1990 até 2018 (**Figura 1**). No entanto, em 2018 foram registradas 59.1 mortes para cada 100.000 nascidos-vivos. Esse número ainda é considerado acima para meta proposta nos ODM e, para ficar dentro da meta da ODS, o país precisa reduzir a mortalidade em 46.6% até 2030 tomando uma série de medidas (MOTTA; MOREIRA, 2021). Investigando mais a fundo, quando tratamos das causas de mortes obstétricas diretas no Brasil, as SIGs são responsáveis pelo maior número de óbitos no intervalo do estudo, sendo seguida por hemorragia, infecção puerperal e aborto ilegal. Ademais, quando investigadas as causas clínicas indiretas, as doenças do aparelho circulatório lideram, mais uma vez, como causa de morte mais frequente.



**Figura 1** - Fonte: Boletim Epidemiológico N° 20. Volume 51. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico N° 20. Volume 51. maio/2020.

## Alterações Fisiológicas do Sistema Cardiovascular Durante a Gestação

Desde o início da gestação até o puerpério, o corpo materno passa por diversas adaptações anatômicas, fisiológicas e metabólicas regidas, em grande parte, por alterações hormonais. Essas adaptações são profundas e contemplam praticamente todos os sistemas do corpo materno de forma a garantir a manutenção da gestação, sendo a maioria delas completamente revertida nas semanas que seguem o fim da gestação. Tendo isso em mente, a compreensão de tais mudanças é fundamental para diferenciar as alterações fisiológicas de processos patológicos, sendo importante para guiar o manejo clínico das mulheres, bem como para direcionar a pesquisa de base nessa área.

O sistema cardiovascular é um dos mais extensamente afetados por essas alterações fisiológicas devido ao aumento da demanda de oxigênio para suprir as necessidades da mãe e do feto. Tais mudanças têm início logo após a implantação da célula-ovo no endométrio, com as adaptações na vasculatura que decorrem do processo de placentação, algumas seguem até mesmo após terminada gestação (HUPPERTZ; PEETERS, 2005; KOLOVETSIYOU-KREINER et al., 2018). A incapacidade do organismo materno de se adequar às alterações decorrentes dessas novas demandas pode trazer à tona doenças cardiovasculares, como as SIGs, tendo como consequência o aumento da morbimortalidade materno-fetal.

Dentre essas adaptações podemos citar:

- a) O **aumento da volemia**, com aproximadamente ~ 45% a mais do volume sanguíneo pré-gestacional. Neste caso, o volume de plasma é proporcionalmente maior em relação aos eritrócitos, o que resulta na chamada "anemia fisiológica" por hemodiluição (SANGHAVI; RUTHERFORD, 2014; VRICELLA, 2017);
- b) O **aumento do débito cardíaco (DC)**, o qual é definido como o produto do **volume sistólico (VS.)** e a **frequência cardíaca (FC)** ( $DC = FC \times VS.$ ) e apresenta aumento de 30% a 50% em relação aos níveis pré-gravídicos. No início da gestação o aumento do débito cardíaco é associado ao aumento do volume sistólico, enquanto mais ao final da gestação, o aumento é atribuído ao aumento da frequência cardíaca (ROVINSKY; JAFFIN, 1966; SANGHAVI; RUTHERFORD, 2014);

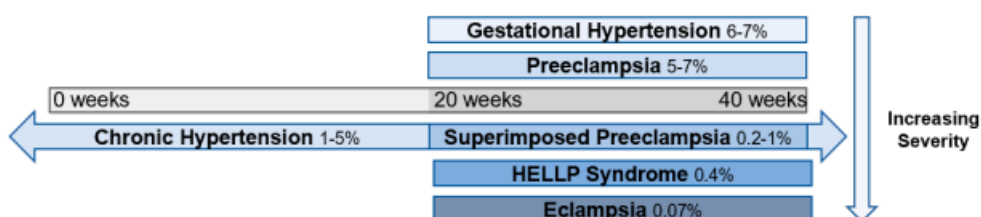


- c) Também ocorre em gestantes a **hipertrofia cardíaca excêntrica**, caracterizada por uma parede cardíaca delgada e aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo. Esse tipo de hipertrofia é diferente de uma hipertrofia patológica e, se precisássemos compará-la, podemos dizer que se assemelha à hipertrofia cardíaca adaptativa em resposta ao exercício físico. Ela está associada à necessidade de acomodar o aumento fisiológico do volume sanguíneo e permite que o coração da gestante funcione de forma mais eficiente frente às novas demandas fisiológicas (CHUNG; LEINWAND, 2014);
- d) As alterações previamente citadas ocorrem sem que haja aumento da pressão arterial porque, a partir do primeiro trimestre de gestações saudáveis, ocorre a **diminuição substancial da resistência vascular periférica** (com decréscimo de ~35% a 40% com relação a níveis não gravídicos) promovida pelo aumento da vasodilatação e redução da resposta aos vasoconstritores (CHESLEY et al., 1965; SANGHAVI; RUTHERFORD, 2014);
- e) Uma parcela da diminuição da resistência vascular periférica está associada ao aumento do **remodelamento da vasculatura uterina e à vasculogênese placentária**. De forma geral, a vasculatura em adultos encontra-se quiescente, as exceções não patológicas são a gestação e o ciclo menstrual (OSOL; MANDALA, 2009; RIZOV; ANDREEVA; DIMOVA, 2017).

### Síndromes Hipertensivas da Gestação (SIGs)

Em algumas mulheres, a gravidez não é acompanhada por estes mecanismos adaptativos do sistema cardiovascular, o que pode levar ao surgimento das SIGs (KALAFAT; THILAGANATHAN, 2017). A *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) identifica quatro categorias de SIGs, são elas: a) Hipertensão gestacional (GH, do inglês *Gestational Hypertension*); b) a Pré-eclâmpsia (PE); c) Hipertensão crônica; e d) a PE sobreposta à hipertensão crônica (YING; CATOV; OUYANG, 2018).

Ainda segundo a ACOG, a hipertensão crônica é caracterizada pela elevação da PA (>140/90 mm Hg) antes da 20ª semana de gestação ou persistência do aumento da PA além de 12 semanas pós-parto. Já a GH é definida como elevação da PA (>140/90 mm Hg) a partir da 20ª semana gestacional sem a presença de outras disfunções de outros sistemas do organismo da gestante. Por sua vez, a PE é definida pelo aumento da PA (>140/90 mm Hg), também a partir da 20ª semana, associada à proteinúria e/ou dano de órgãos finais (fígado, rins, cérebro). PE sobreposta à hipertensão crônica é caracterizada pelo aumento da PA (>140/90 mm Hg), previamente observado, que a partir da 20ª semana gestacional passa a ser acompanhado de proteinúria e/ou dano de órgãos vitais. Além dessas, existem duas complicações graves da PE, são elas: a) a síndrome HELLP (do inglês *hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count*) na qual a gestante desenvolve hemólise, níveis elevados de enzimas hepáticas e baixa contagem de plaquetas; e b) a eclâmpsia quando a gestante passa a ter convulsões ou entra em coma (OPICHKA et al., 2021; YING; CATOV; OUYANG, 2018). A **Figura 2**, elaborada por Opichka *et al.*, representa um esquema que indica a cronologia de desenvolvimento das SIGs durante a gestação junto ao grau de gravidade da doença e sua incidência



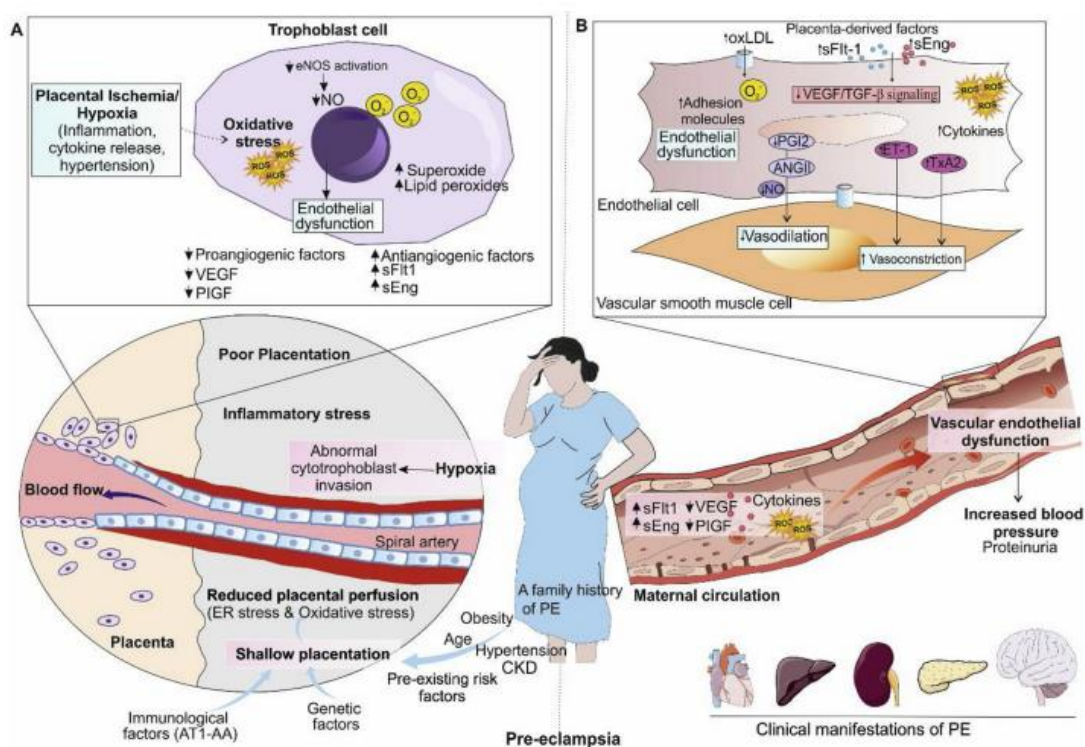
**Figura 2** – Esquema de Opichka et al. indicando as SIGs de acordo com sua cronologia, grau de gravidade e incidência. A GH é definida pelo aumento da PA (>140/90 mmHg) após a 20ª semanas de gestação, enquanto que a PE, além do aumento da PA, é acompanhada de proteinúria e disfunção dos órgãos vitais. A hipertensão crônica consiste no aumento da PA antes da 20ª semana de gestação ou quando o aumento continua 12 semanas após o parto e pode ocorrer em sobreposição com a PE. A síndrome HELLP, caracterizada pela hemólise, níveis elevados de enzimas hepáticas e baixa contagem de plaquetas, e a eclâmpsia, caracterizada por convulsões e coma, classificadas como complicações da PE.

## Pré-Eclâmpsia

O conhecimento da PE data de ~400 a.C quando Hipócrates, apesar do conhecimento e tecnologia limitados, indicou que a dores de cabeça acompanhadas de convulsões durante a gravidez eram consideradas como uma complicação/“algo ruim”. No entanto, o termo (pré)-eclâmpsia surgiu apenas em 1619 no Tratado de Ginecologia de Varandaeus, e desde então tem sido associado a diversas etiologias, e, apesar de termos evoluído muito nesse aspecto, atualmente ainda não se sabe a causa específica e nem a “cura” da PE (BELL, 2010). As únicas soluções atuais são o tratamento com fármacos anti-hipertensivos seguros para ao período gestacional, combinados ao acompanhamento médico, ou, em casos graves, a indução do parto (AMARAL et al., 2017).

## Fatores de risco e fisiopatologia

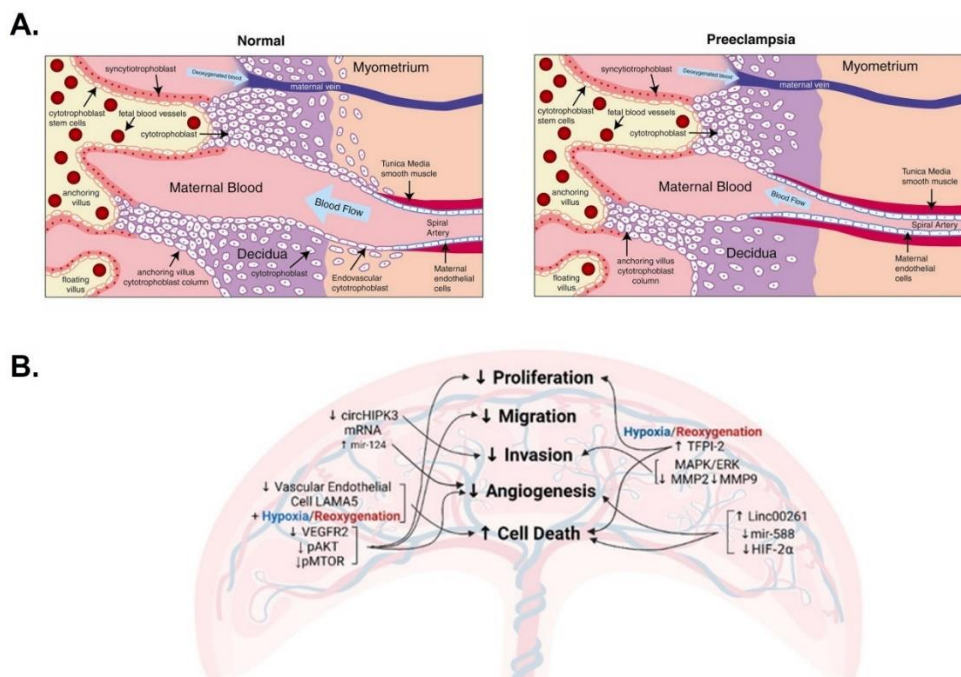
Atualmente, há consenso na literatura de que a etiologia da PE seja multifatorial e os principais fatores de risco incluem histórico de PE, hipertensão crônica, diabetes mellitus pré-gestacional, gravidez gemelar, síndrome anti-fofolípide, e obesidade, além de outros fatores como lúpus eritematoso, idade materna avançada, nuliparidade, histórico de doença renal crônica, e utilização de tecnologias de reprodução assistida. Por fim, alguns outros fatores de riscos mais raros incluem o histórico familiar de PE e fetos com trissomia do cromossomo 13 (RANA et al., 2019). Independentemente de um mecanismo específico, desenvolveu-se o modelo de dois estágios da doença, apontando-se a isquemia placentária como fator incipiente para seu desenvolvimento (**Figura 3**) (BELL, 2010; HLADUNEWICH; KARUMANCHI; LAFAYETTE, 2007; RANA et al., 2019; ROBERTS; HUBEL, 2009).



**Figura 3 – Fisiopatologia da pré-eclâmpsia**, por Ahmadian et al: A) causas multifatoriais, como fatores genéticos, ambientais e imunológicos levam ao desenvolvimento da PE, que tem como primeiro estágio da doença, a remodelação deficiente da arteríolas espiraladas uterinas, resultando em isquemia/hipóxia placentária e inflamação. (B) Com isso, a placenta passa a liberar fatores anti-angiogênicos (sFlt-1, sEng) que reduzem os níveis de fatores pró-angiogênicos circulantes (VEGF, PlGF), além de fatores pró-inflamatórios e ROS, culminando na disfunção endotelial. Essa disfunção endotelial é caracterizada principalmente pela redução da produção e biodisponibilidade de NO, bem como aumento da expressão de moléculas de adesão de células inflamatórias, o aumento da atividade do tromboxano A2 (TxA2) e da endotelina (ET-1) resultando em maior constrição vascular. As consequências dessa disfunção endotelial sistêmica levam às manifestações clínicas da PE que envolvem órgãos como cérebro, rins, fígado e, a longo prazo, o coração. ET-1: endotelina 1, TxA2: tromboxano A2; oxLDL: lipoproteína de baixa densidade oxidada; ROS: espécies reativas de oxigênio; LDL: lipoproteína de baixa densidade; sFlt-1: tirosina quinase-1 solúvel; sEng: endoglinina solúvel; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; PlGF: fator de crescimento placentário; NO: óxido nítrico; TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento beta (AHMADIAN et al., 2020).

**A. Primeiro estágio isquemia/hipóxia placentária:**

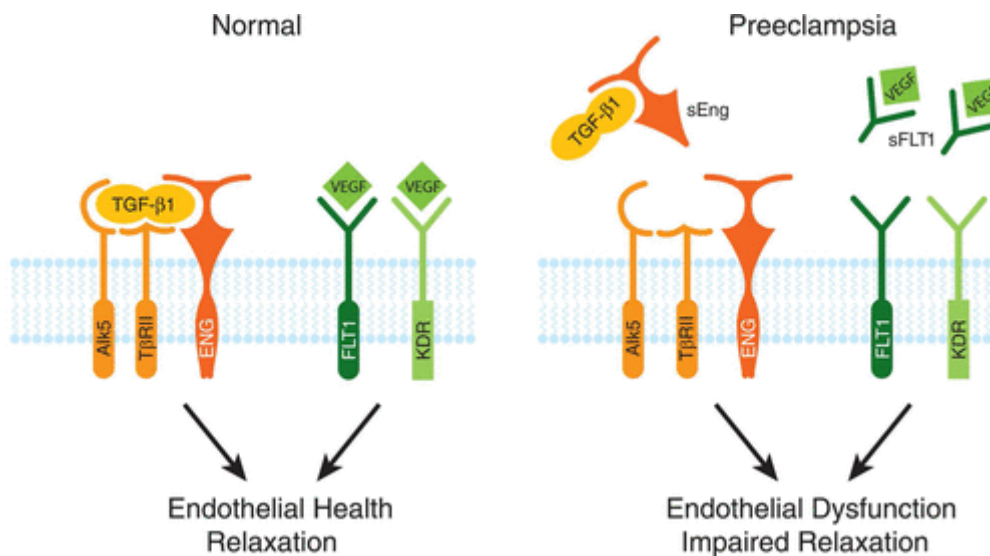
No início do primeiro trimestre da gestação, entre a 18ª e a 20ª semanas, instala-se o processo referido como pseudovasculogênese. Esse processo é caracterizado pela migração dos citotrofoblastos do blastocisto para a decídua e miométrio em direção as arteríolas uterinas espiraladas, seguida de diferenciação fenotípica do perfil fetal epitelial para endotelial (JI et al., 2013; MCMASTER; ZHOU; FISHER, 2004; POLLHEIMER et al., 2018). Essa migração e diferenciação dos citotrofoblastos ocorre em resposta a diversos mecanismos como, alterações no perfil de expressão de citocinas, moléculas de adesão, constituintes da matriz extracelular (MEC), metaloproteinas e o antígeno de histocompatibilidade e tem como produto final o remodelamento das arteríolas, resultando no aumento de seu calibre (**Figura 4 A**) (DAMSKY et al., 1994; DAMSKY; FITZGERALD; FISHER, 1992; FISHER; DAMSKY, 1993; WALLACE et al., 2014). Esse processo é essencial para uma gestação saudável e mulheres com PE apresentam alterações, de forma que apenas ~30-50% das arteríolas espiraladas sofrem remodelamento, o que culmina na redução da transferência de oxigênio entre a circulação materna e fetal e isquemia/hipóxia placentária (KNÖFLER; POLLHEIMER, 2013; MCMASTER; ZHOU; FISHER, 2004). Os mecanismos já identificados e propostos para essa placentação inadequada, característica da PE, têm sido amplamente estudados nos últimos anos e foram revisados recentemente por Opichka et al. (**Figura 4 B**). No entanto a causa dessa disfunção permanece desconhecida.



**Figura 4** – Esquemas adaptados de Lam et al. e Opichka et al.. A) Processo de placentação normal vs. processo de placentação disfuncional da PE: Durante o processo de invasão vascular da decídua e miométrio, os citotrofblastos diferenciam-se de um fenótipo epitelial para um fenótipo endotelial, um processo referido como pseudovasculogênese (imagem à esquerda). Na PE, os citotrofblastos não conseguem diferenciar-se para o fenótipo endotelial invasivo. Com isso, a invasão das arteríolas espiraladas uterinas é superficial, e os vasos mantêm calibre reduzido (imagem à direita). B) Mecanismos associados à placentação disfuncional da PE: indica alguns mecanismos moleculares associados à redução de processos como a proliferação, migração, invasão e angiogênese além do aumento da morte celular relacionados à disfunção da placentação em PE. Siglas do inglês HIPK3: circular RNA homeodomain interacting protein kinase 3; LAMA5: laminin subunit alpha-5; VEGFR2: vascular endothelial growth factor receptor 2; pAKT, phosphorylated protein kinase B; pMTOR, phosphorylated mammalian target of rapamycin; TFPI-2: tissue factor pathway inhibitor-2; MAPK: mitogen-activated protein kinase; ERK: extracellular-signal-regulated kinase; MMP: matrix metalloproteinase; HIF-2 $\alpha$ : hypoxia-induced factor-2 $\alpha$ .  $\uparrow$  refere-se ao aumento e  $\downarrow$  à redução.

### B. Segundo estágio ou síndrome materna:

Em 1989, Roberts e Taylor et al. propuseram pela primeira vez que a PE é causada pela liberação de fatores desconhecidos pela placenta isquêmica/hipóxica na circulação materna. Esses fatores circulantes somados aos efeitos de fatores de risco constitutivos maternos, como fatores genéticos, comportamentais e ambientais contribuem para o desenvolvimento do segundo estágio da doença, conhecido como síndrome materna, e marcado por disfunção endotelial sistêmica (ROBERTS et al., 1989). Desde então, diversos fatores circulantes já foram identificados e continuam sendo descobertos. Alguns deles são, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor- $\alpha$* ), as interleucinas IL-6, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , o ligante Fas, espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), lipídios oxidados e autoanticorpos agonistas contra o receptor-1 de angiotensina (AT1-AAAs) (CONRAD; MILES; BENYO, 1998; LAM; LIM; KARUMANCHI, 2005; WALLUKAT et al., 1999). No entanto, não existem evidências suficientes de que estas moléculas estejam diretamente associadas à causa da síndrome materna. A descoberta mais recente e robusta foi a dos fatores anti-angiogênicos em sua forma solúvel como a sENG (do inglês *soluble endoglin*) e o sFLT1 (do inglês *soluble fms-like tyrosine kinase 1*), pelo grupo do Dr. Karumanchi em 2003 (MAYNARD et al., 2003; MUTTER; KARUMANCHI, 2008). O sFLT1 e a sENG são responsáveis pelo sequestro de moléculas pró-angiogênicas como VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*), PlGF (do inglês *placental growth factor*) e TGF- $\beta$ 1 (do inglês *transforming growth factor- $\beta$* ) na circulação (**Figura 5**). Além de estimular a angiogênese, o VEGF, quando ligado a seu receptor VEGFR-2 do endotélio, também é capaz de ativar a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, do inglês *endothelial nitric oxide synthase*) pela via de sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/proteína quinase b (AKT) o que resulta na produção de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), um potente vasodilatador endógeno e marcador de função endotelial (GRUMMER et al., 2009; PANDEY et al., 2018). Por sua vez, o PlGF atua ligando-se aos VEGFRs e é capaz de aumentar sua afinidade pelo VEGF além de potencializar sua cascata de sinalização através da trans fosforilação do receptor (CHAU; HENNESSY; MAKRIS, 2017). O TGF- $\beta$  liga-se a ENG endotelial regulando processos de diferenciação, migração, e sobrevivência do endotélio (LEBRIN et al., 2005; MA et al., 2020).



**Figura 5** – Esquema de Powe et al., 2011. Disfunção endotelial causada por sFLT1 e sENG: durante a gestação os níveis normais de sinalização VEGF e TGF-  $\beta$ 1 são fundamentais para a manutenção da homeostase vascular. A secreção placentária de sFLT1 e sENG (proteínas antiangiogênicas endógenas circulantes) suprime a sinalização de VEGF e TGF-  $\beta$ 1 na vasculatura de mulheres com PE. Como resultado, tem-se o desenvolvimento da disfunção endotelial, com redução dos níveis de óxido nítrico.(RANA et al., 2019)

Além da hipertensão, a proteinúria, os problemas hepáticos, e as complicações, tais como edema cerebral também são indicativos do papel central e multi-sistêmico da disfunção do endotélio nas formas graves da doença (LAM; LIM; KARUMANCHI, 2005; LAMARCA, 2012; CIPOLLA, 2007; EUSER; CIPOLLA, 2007). Todos esses efeitos deixam de existir após o parto, no entanto, o histórico de PE tem sido associado ao risco elevado para aterosclerose e outras doenças cardiovasculares ao longo da vida dessas mulheres, sendo referido como um “primeiro evento de doença vascular” e que, portanto, merece ser considerado para acompanhamento e prevenção (DINIZ; PAES; DINIZ, 2020; MUIJSERS et al., 2019).

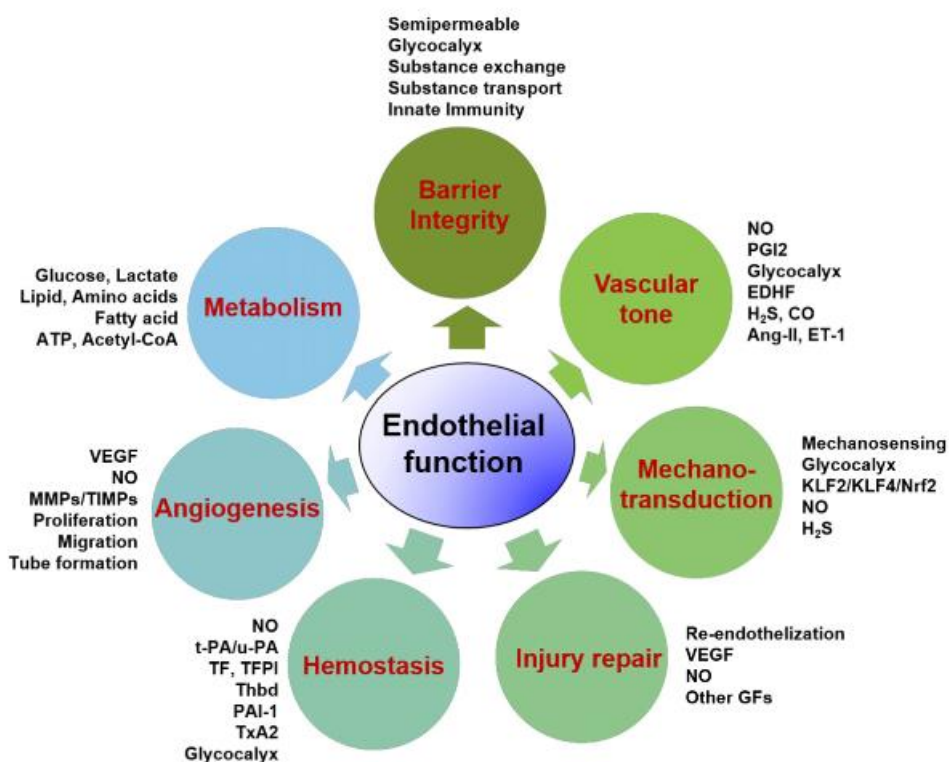
### Similaridades e diferenças com relação à fisiopatologia da hipertensão gestacional

Até hoje não é claro se GH tem uma etiologia distinta da PE ou se ambas as condições são parte de um fenômeno comum (YING; CATOV; OUYANG, 2018). GH e PE apresentam fatores de risco semelhantes e compartilham uma probabilidade próxima (de 39% e 32%, respectivamente) de desenvolvimento de hipertensão após aproximadamente dois anos e meio do fim da gestação (comparado a 1% em HP) (VEERBEEK et al., 2015). Entretanto, o risco de resultados adversos, como parto prematuro, é aproximadamente 3 vezes maior em PE em comparação à GH (SHEN et al., 2017), e pode estar associado a diferenças com relação ao perfil de assinatura inflamatória de cada condição, com GH tendo um perfil compensatório mais efetivo em relação à PE (TANGERÅS et al., 2015). Tendo em vista as similaridades citadas, é possível que, apesar de apresentarem resposta patológica distinta, a origem da hipertensão na gestação seja comum entre PE e GH. Reforçando essa ideia, um estudo indicou que fatores de risco de pré-gestacionais são responsáveis por mais da metade dos casos de SIGs, além de estarem associados aos níveis de pressão arterial, Índice de Massa Corpórea (IMC), e lipídios plasmáticos (ROMUNDSTAD et al., 2010).



## A (Dis)Função do Endotélio: além do óxido nítrico

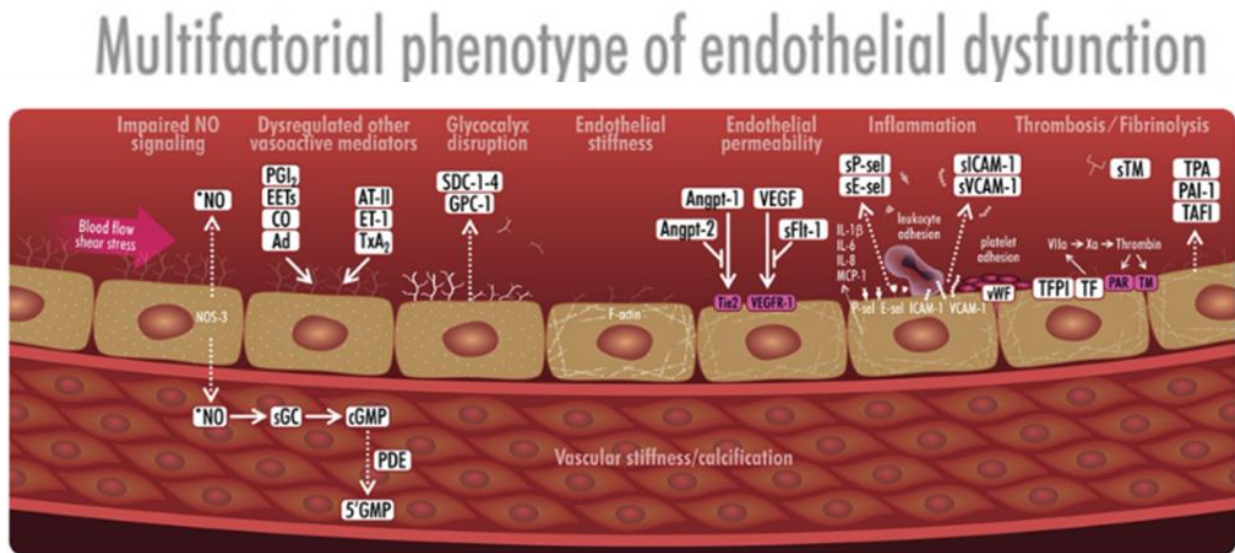
O endotélio consiste em uma monocamada de células endoteliais que revestem o lúmen de todos os leitos vasculares desde artérias e veias, até capilares e vasos linfáticos. Por estar localizado entre o sangue e diversos tecidos e órgãos, o endotélio apresenta papel fundamental e clássico, integrando e coordenando a relação entre eles através do controle da permeabilidade, da hemostasia e regulação do tônus vascular (LÜSCHER; BARTON, 1997). Além disso, estudos recentes também têm associado ao endotélio um papel muito mais amplo (**Figura 6**), incluindo a seu *hall* de atividades, processos como a regulação do metabolismo, autorregulação da angiogênese e reparo de lesões e mecanotransdução, associada às forças hemodinâmicas levando à regulação da transcrição gênica (HASAN; FISCHER, 2021c; XU et al., 2021).



**Figura 6 – As funções do endotélio saudável**, por Xu et al., 2021: **1) Barreira semipermeável:** papel na regulação da troca e transporte de substâncias e células do sistema imune; **2) regulação do tônus vascular:** através do equilíbrio da produção de vasodilatadores (NO, PGI<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S e EDHF) e vasoconstritores (ET-1 e Ang-II); **3) mecanotransdução:** através de mecanosensores em resposta às forças hemodinâmicas levando a alterações do perfil de expressão gênica pela ação de fatores de transcrição (KLF2/KLF4/Nrf2) que por sua vez, promovem aumento da produção de NO e H<sub>2</sub>S; **4) reparo de lesão vascular:** através da reendotelização e mediante o auxílio do VEGF, NO, e outros fatores de crescimento; **5) regulação da hemostasia:** através da secreção de moléculas antiplaquetárias e anticoagulantes tais como NO, o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), ativador do plasminogênio do tipo u-PA, o TFPI, e a Thbd e PAI-1; **6) regulação da angiogênese:** através de moléculas como o VEGF, NO, MMP/TIMPs, que desencadeiam a proliferação e a migração endotelial levando à formação de tubos; **7) Metabolismo:** atuação do endotélio no metabolismo de glicose, lípidos, aminoácidos, ácidos graxos, ATP, lactato, e acetil-CoA auxiliando na manutenção do fornecimento de oxigênio e nutrientes para todos os tecidos do organismo. PGI<sub>2</sub>: prostaciclina; H<sub>2</sub>S : sulfeto de hidrogênio; EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio; ET-1: endotelina-1; Ang-II: angiotensina II; KLF2/4: Kruppel Like Factor 2/4; Nrf2: fator nuclear derivado de eritróide 2; t/u-PA: ativador de plasminogênio tecidual/do tipo uriquinase; TFPI : inibidor da via do factor tecidual; Thbd trombosmodulina; PAI-1: inibidor-1 do ativador do plasminogênio; MMP: metaloproteinasas da matriz; TIMPs: inibidores da MMPs.

O termo “disfunção endotelial” foi proposto por Gimbrone em meados da década de 80 e definido como a redução da capacidade de vasodilatação observada em diversas patologias que envolviam o sistema cardiovascular (POREDOŠ, 2002). Sua definição pode ser atribuída, de forma reducionista, à redução da vasodilatação, principalmente associada à redução da produção e biodisponibilidade de NO, ou a uma definição mais ampla e atual que engloba

qualquer alteração que comprometa a homeostasia do endotélio (XU et al., 2021). Essa disfunção está associada a uma vasta gama de insultos que podem ter tanto caráter físico quanto bioquímico, além de fenótipos múltiplos (**Figura 7**) Alguns exemplos são a alteração de diferentes mediadores da vasodilatação e vasoconstrição além do NO, a perda do glicocálix, aumento da permeabilidade, rigidez endotelial (vascular), inflamação, resposta endotelial pró-trombótica e comprometimento da fibrinólise (DAIBER; CHLOPICKI, 2020). É importante ressaltar que cada uma dessas alterações não ocorre individualmente e que, pelo contrário, o seu conjunto é o que leva a quadros patológicos e às doenças cardiovasculares.



**Figura 7 – O fenótipo multifatorial da disfunção endotelial**, por Daiber e Chlopicki., 2020: Os processos que contribuem para a disfunção endotelial não se limitam à função do NO e envolvem a desregulação de outros fatores vasoativos, perda do glicocálix, aumento da rigidez endotelial, aumento da permeabilidade, inflamação, além de alterações dos mecanismos trombóticos.

### Espécies reativas de oxigênio e macromoléculas oxidadas

ROS (superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , ânions e radicais hidroxil  $OH^{\cdot}$ ) são moléculas intermediárias do oxigênio que atuam como segundos mensageiros importantes das células. No entanto, desequilíbrio entre agentes antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase, e ROS, ou radicais livres, pode levar ao dano celular pelo estado de estresse oxidativo (EGEA et al., 2017). Esse dano ocorre devido à oxidação de macromoléculas fundamentais como as proteínas e lipídios, o que pode resultar em dano da membrana celular, além de ácidos nucleicos, causando alterações na estrutura de DNA (XU et al., 2021). A maior parte das doenças cardiovasculares está associada não só ao aumento de ROS, mas também à formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*) que inclui produtos derivados do NO e suas principais fontes são as NADPH oxidases, a mitocôndria e a enzima eNOS desacoplada (GRYGLEWSKI; PALMER; MONCADA, 1986; SCHULZ et al., 2014). O dano causado pelas macromoléculas oxidadas está relacionado ao desenvolvimento de um perfil inflamatório, via expressão de moléculas de adesão da membrana (MCP-1, ICAM1, VCAM, SELE) alterações do citoesqueleto, através da oxidação de proteínas reguladoras da actina ou modificação de redes de sinalização envolvidas com a polimerização do citoesqueleto de actina, e redução da vasodilatação pelo sequestro de NO e consequente formação de peroxinitrito (MITTAL et al., 2014; NAVAB et al., 1991; SPRINGSTEAD et al., 2012). Além disso, o LDL oxidado (oxLDL), acumula-se no espaço subendotelial do endotélio disfuncional, onde é fagocitado por macrófagos que passam à células espumosas, processo fundamental para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas

(JOVINGE et al., 1996). Ademais, indo de acordo com seu papel na aterosclerose, um grupo demonstrou que o oxLDL, junto a mieloperoxidase, é capaz de inibir a angiogênese *in vitro* através do aumento de miR-22 e heme-oxigenase 1 (HMOX1, do inglês *Heme oxygenase*) sugerindo que altos níveis de oxLDL prejudicam a capacidade do endotélio de reparar danos, o que pode contribuir para o desenvolvimento e progressão da formação de placa de ateroma (DAHER et al., 2014).

## Inflamação

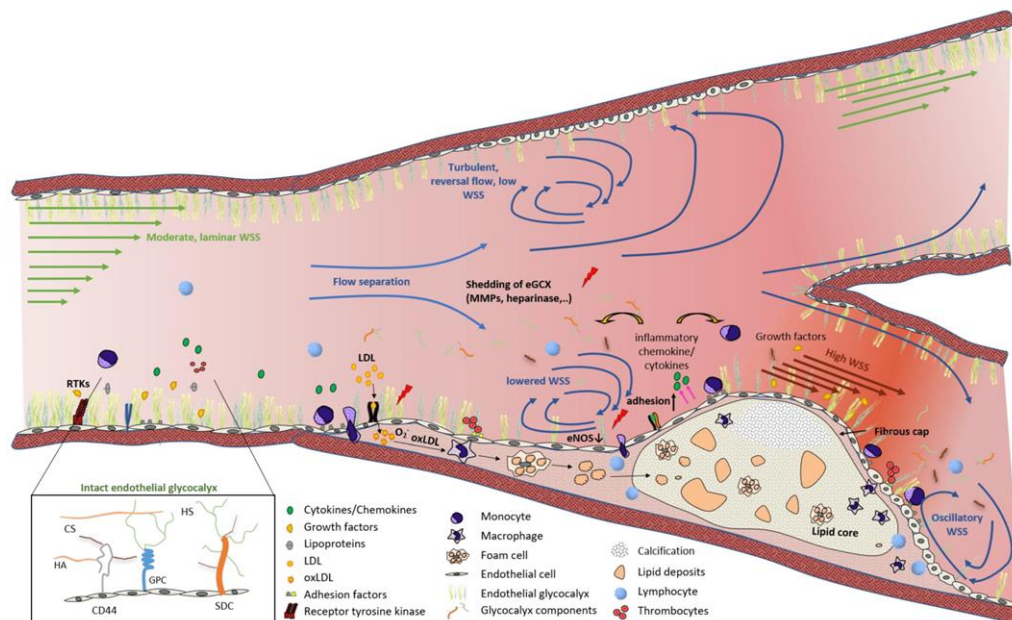
A inflamação do endotélio tem sido amplamente investigada na literatura devido à sua correlação com o início, a progressão e o prognóstico de doenças cardiovasculares (GONZALEZ; SELWYN, 2003; HAYBAR et al., 2019). A cascata de efeitos colaterais do estresse oxidativo culmina no início da inflamação crônica e na disfunção do endotélio, como apontado no item anterior. Porém, essa condição ainda pode ser exacerbada, em casos patológicos, pela atuação de mediadores pró-inflamatórios como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  que agem no endotélio induzindo a liberação local de IL-6 que induz a produção e secreção de fibrinogênio e proteína c-reativa levando ao aumento do quadro inflamatório (LIBBY, 2017).

Os fatores de transcrição NF-kB (do inglês *nuclear factor kappa B*) e KLF2/KLF4 possuem papel fundamental na inflamação vascular. O NF-kB regula o aumento da expressão de genes pró inflamatórios *IL6*, *IL1 $\beta$* , *CCL2* (MCP-1), *ICAM1*, *VCAM1* e e-selectina (*SELE*) enquanto KLF2 e KLF4 reduzem a *CCL2* e *VCAM1* (SUN et al., 2019). O aumento dessas citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão levam à migração e adesão de leucócitos iniciando o processo de diapedese (para ou trans celular). Esse processo pode ser fisiológico, e simplesmente levar o leucócito ao sítio inflamatório tecidual, ou pode ser o ponto chave para o início da formação da placa de ateroma já que, uma vez na íntima, os leucócitos passam a liberar mais citocinas, recrutando mais células do sistema inflamatório e colaborando para a formação da neointima (BRAUNERSREUTHER; MACH, 2006; MULLER, 2013).

## Shear Stress

As células endoteliais encontram-se sobre a ação constante das forças de fricção, provenientes do bombeamento do sangue pelo coração, conhecidas como estresse de cisalhamento (SS, do inglês *Shear Stress*). O SS é afetado pelas características anatômicas dos vasos sanguíneos, sendo laminar (LSS) em regiões lineares e turbilhonado ou oscilatório (OSS) em regiões curvas ou com bifurcações (**Figura 8**). As células endoteliais apresentam mecanosensores em sua superfície que são capazes de detectar e traduzir esses estímulos mecânicos em respostas biológicas e fisiopatológicas (URSCHEL et al., 2021). Alguns dos mecanosensores conhecidos são as proteínas integrinas, NOTCH1, o complexo mecanosensor formado pelas proteínas PECAM1 (do inglês *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), VE-caderina e VEGFR, o receptor de Angiotensina Tipo 1 (AT1R), o canal iônico Piezo 1, bem como componentes estruturais como o glicocálix e o citoesqueleto (BARAUNA et al., 2013; CURRY; ADAMSON, 2012; LI et al., 2014; MACK et al., 2017; TZIMA et al., 2001). A partir desses mecanosensores o SS é capaz de regular a função e disfunção do endotélio, com LSS protegendo o endotélio por sua ação anti-inflamatória e vasodilatadora, além de promover a quiescência, estabilidade da barreira e a homeostasia. O OSS, por sua vez, leva as células endoteliais ao perfil disfuncional, caracterizado pela inflamação, vasoconstrição, aumento na permeabilidade e proliferação, indução de apoptose e aquisição de um fenótipo mesenquimal (EndMT, do inglês *endothelial to mesenchymal transition*) (DEMOS; TAMARGO; JO, 2021).





**Figura 8 - Padrões de SS ao longo dos vasos**, por Urschel et al., 2021: Em segmentos retos dos vasos o LSS leva a um fenótipo endotelial homeostático, quiescente, anti-inflamatório, com capacidade vasodilatadora, integridade da barreira e da permeabilidade. Em locais de bifurcação, a separação do fluxo provoca o OSS, um fluxo turbulento e inverso. O OSS resulta em disfunção endotelial, caracterizada pela indução de cascatas de sinalização inflamatória, vasoconstrição, aumento da permeabilidade, proliferação, apoptose e fenótipo mesenquimal, o que culmina na formação da placa de ateroma nessas regiões.

Os principais responsáveis pelo perfil inflamatório nas regiões de OSS são NF- $\kappa$ B, e BMP4 aumentados, e o KLF2/KLF4, reduzidos (JIANG et al., 2014; MOHAN; MOHAN; SPRAGUE, 1997; PINHEIRO-DE-SOUSA et al., 2022; VAN DER HEIDEN et al., 2010). Com relação à vasoconstrição, enquanto o LSS aumenta a expressão da eNOS, o OSS eleva a expressão de NADPH oxidases e de xantinas oxidases e promove o desacoplamento da eNOS, levando ao aumento ROS e reduzindo a disponibilidade do NO (LI et al., 2011). Além disso, estudos demonstraram que o OSS é capaz de reverter o perfil quiescente do endotélio adulto saudável através da ativação de HIF- $\alpha$  e do consequente aumento do VEGF e da angiogênese (FENG et al., 2017), além de ativar a ERK1/2 e Akt enquanto inibe a cip1 e a AMPK (GUO; CHIEN; SHYY, 2007; LI et al., 2011). O aumento da proliferação do endotélio, associado ao OSS, pode estar relacionado à formação de neovascularização em placas de ateroma características dessas regiões (SLUIMER; DAEMEN, 2009). Com relação à apoptose, a literatura indica que o LSS seja capaz de proteger as células endoteliais contra a apoptose pelo aumento da expressão de eNOS e de superóxido dismutase (DIMMELER et al., 1999). Já o OSS apresenta perfil pró-apoptótico por aumentar a expressão de IL-1 $\beta$  nas células endoteliais que, por sua vez, exacerba o estresse do retículo endoplasmático pela via de sinalização IRAK2/CHOP (do inglês *Interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2/ DNA Damage Inducible Transcript 3*) (PAN et al., 2017).

A permeabilidade da barreira endotelial também é afetada na condição de OSS pela fosforilação das proteínas de junção PECAM1, VE-caderina e VEGFR e remodelamento do citoesqueleto levando à redução da ligação célula-célula e favorecendo a ligação da célula endotelial à membrana basal (KOMAROVA et al., 2017). O aumento da permeabilidade associado ao OSS também pode estar associado ao remodelamento da matriz, o que pode ocasionar seu espessamento e endurecimento. Esse remodelamento deve-se à ativação das catepsinas K, L e S, diminuição da TIMP3 e consequente aumento de MMPs, desintegrinas e metaloproteínas (ADAMs) (PLATT et al., 2007; PLATT; ANKENY; JO, 2006).

O fenômeno de EndMT implica na perda de contato célula-célula e afeta a polaridade fazendo com que as células migrem para a íntima (SOUILHOL et al., 2018). Esse processo se dá a partir de uma série de mecanismos, envolvendo as vias do TGF- $\beta$  e Smad, que levam à perda de marcadores endoteliais e ao aumento de marcadores de fibroblastos e células musculares lisas (MAHMOUD et al., 2017). O OSS induz esse fenótipo em células endoteliais diretamente pelo aumento da ERK5 e HIF1 $\alpha$  (MOONEN et al., 2015).

Além disso, recentemente demonstramos que o perfil biológico derivado da análise do transcriptoma de células endoteliais submetidas a fatores de risco para doenças cardiovasculares [hipóxia química (CoCl<sub>2</sub>), lipídios oxidados (OxPAPC), inflamação (IL-1 $\beta$ ) e OSS] individualmente não recapitula os efeitos da combinação desses fatores *in vitro* (PINHEIRO-DE-SOUSA et al., 2022). Isso ressalta a importância do uso de metodologias *in vitro* que contemplem o uso de SS para a melhor compreensão de doenças cardiovasculares e, principalmente em casos como a PE, em que ainda não há uma completa compreensão da fisiopatologia, o uso do SS nos aproxima, ainda que de forma limitada, dos reais efeitos que os fatores circulantes podem causar *in vivo*.

### **Modelos experimentais de Pré-eclâmpsia: vantagens e limitações**

A carência de modelos animais espontâneos em PE limita o entendimento da doença (BURTON et al., 2019; CHAU et al., 2021). Outro fator limitante é a dificuldade de obtenção de amostras biológicas maternas, o que acaba direcionando a maioria dos estudos na área para o tecido placentário (MARTINEZ-FIERRO et al., 2018). Como alternativa, considerando a característica fisiopatológica de fatores presentes na circulação materna, o uso do modelo *in vitro* de incubação de células endoteliais ou modelo *ex-vivo* com o plasma/soro de pacientes com PE tem se mostrado viável para a compreensão de diversos mecanismos relacionados a disfunção endotelial nessa síndrome. Uma das características mais comumente avaliada nesse modelo é a produção de NO, medida de forma direta ou indireta (dosagem dos metabólitos nitrito e nitrato) e mediante a determinação da atividade da eNOS. Com relação a esse marcador, há discordância nos efeitos do plasma sobre o endotélio *in vitro*, com estudos relatando aumento (DAVIDGE; BAKER; ROBERTS, 1995), ausência de alteração (SILVER et al., 1996) e, em estudos mais recentes do nosso grupo e outros, utilizando técnicas de medidas indiretas tradicionais somadas a técnicas de detecção *real time* diretas, indicando redução (CALDEIRA-DIAS et al., 2019, 2021; MURUGESAN et al., 2022; ROCHA-PENHA et al., 2017; VIANA-MATTIOLI et al., 2020). É importante ressaltar que um estudo que avaliou os efeitos do plasma de PE em quatro tipos celulares [células endoteliais de microvasculatura dérmica, células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), células endoteliais humanas primárias de microvasculatura da decídua e células endoteliais bovinas de microvasculatura coronária] indicou aumento de nitrito apenas em células endoteliais bovinas, associando o plasma de PE ao aumento de NO *in vitro* (WELLINGS; BROCKELSBY; BAKER, 1998). Além disso, estudos demonstraram a redução do NO na circulação materna de mulheres com PE em comparação com HP, o que reforça os resultados encontrados por nosso grupo (AYDIN et al., 2004; BERNARDI et al., 2015; DIEJOMAOH et al., 2004; SANDRIM et al., 2008; TASHIE et al., 2020).

Diversos estudos utilizando o modelo *in vitro* apontam alterações desde a expressão gênica até a atividade de proteínas, bem como modificações de processos biológicos (CALDEIRA-DIAS et al., 2018; CALICCHIO et al., 2013; ENGLISH et al., 2013; FAAS et al., 2010; LIP, 2020; LUIZON et al., 2016; MURUGESAN et al., 2022; ROCHA-PENHA et al., 2017; SANKARALINGAM; XU; DAVIDGE, 2010). No entanto, ainda são raros os estudos que utilizam

esse modelo combinado à técnicas exploratórias avançadas como as “ômicas”. Com relação a técnica de transcriptoma, um estudo relatou não ter encontrado alterações na expressão gênica de HUVECs e de células endoteliais de microvasculatura glomerular incubadas com plasma de PE grave pela técnica de *microarray* (DONKER et al., 2016). Em outro estudo, que avaliou a expressão de HUVECs incubadas com plasma de mulheres com PE obtidos em dois momentos diferentes (16 e 28 semanas), foi demonstrado aumento na expressão do gene c-Fos (FOS) quando em comparação a gestantes saudáveis (HP, do inglês *Healthy Pregnant*) utilizando as técnicas de *microarray* e qRT-PCR (MACKENZIE et al., 2012). Por sua vez, Calicchio et al., que também utilizou a técnica de *microarray*, porém com técnicas de análise mais avançadas, identificou 116 genes diferencialmente expressos (75 deles aumentados e 41 reduzidos em PE) em HUVECs incubadas com o plasma de gestantes com PE vs. o plasma de GH, sendo que alguns deles estavam associados a vias biológicas importantes como à homeostasia do endotélio, à regulação de processos apoptóticos associados ao estresse do retículo endoplasmático, e à biossíntese de ácidos graxos (CALICCHIO et al., 2013). Dentre os genes encontrados por esse último grupo podemos citar como principais o *EDNI* e o *JDP2* (com *fold change* de 1.88 e -2.67, respectivamente). O gene *EDNI* codifica a endotelina 1, um potente fator vasoativo secretado por células endoteliais que está associado a diversas doenças cardiovasculares e à PE (SALEH et al., 2016; SCHIFFRIN, 2001). Já o gene *JDP2*, foi indicado como um importante fator de transcrição associado à regulação de um subgrupo de genes que possuem sua expressão regulada pelo plasma de PE nas HUVECs (seu papel foi confirmado por inibição por siRNA).

Vale a pena ressaltar, que, até o presente momento, apenas um estudo avaliou o efeito do SS no modelo de incubação de células endoteliais em cultura com plasma de mulheres com PE, demonstrando reversão induzida pelo fluxo laminar nos efeitos do plasma observados no modelo (BAKER et al., 1996). Porém, esse estudo restringiu-se a avaliação de apenas três parâmetros, sendo eles a produção de NO por nitrito no sobrenadante de cultura, a produção de prostaciclina e de endotelina, limitando a melhor compreensão dos processos subjacentes afetados pela exposição ao plasma de paciente com PE (BAKER et al., 1996). Apesar de não terem encontrado diferenças nos níveis de NO entre as células endoteliais incubadas com os plasmas de PE e HP a conclusão do estudo foi a de que o SS é capaz de alterar os efeitos do plasma de PE em células endoteliais e que, talvez por esse motivo, muitos dos estudos *in vitro* não retratassem o que é observado *in vivo*.

## **Justificativa para esta dissertação**

Apesar da grande influência da PE na morbidade e mortalidade materno-fetal, até hoje não se sabe a causa específica dos surgimento dos sintomas clínicos dessa doença e poucas frentes de tratamento estão disponíveis. Conhecer os mecanismos pelos quais a disfunção endotelial é promovida na PE é essencial para propor tratamentos mais efetivos e desfechos mais favoráveis às gestantes e aos recém-nascidos acometidos. A ausência de modelos animais espontâneos em PE, a dificuldade de obtenção de amostras biológicas maternas sem o uso de metodologias invasivas e as limitações da comparação da função vascular do modelo *in vitro* com as alterações encontradas *in vivo* são os maiores desafios para melhor compreensão da doença. Nesse contexto, a implementação de novas tecnologias que aproximem o modelo *in vitro* de disfunção endotelial associada à PE com o ambiente hemodinâmico original do sistema cardiovascular humano é de suma importância. Ademais, considerando que o SS ativa diversas vias de mecanotransdução essenciais para a regulação do funcionamento, do fenótipo das células endoteliais e, conseqüentemente, modula a manutenção do tônus vascular, faz se necessário incluir simulações de fluxo sanguíneo

nos modelos de estudo *in vitro* de avaliação da função endotelial em PE. Assim, com o presente projeto, exploramos os efeitos do plasma de gestantes com PE, GH e HP em células endoteliais submetidas a dois padrões de SS encontrados na circulação, para identificação de vias celulares envolvidas com base na análise de expressão gênica global em células endoteliais primárias humanas e seleção de potenciais alvos terapêuticos para a disfunção endotelial associada às SIGs e, em particular, a PE.

# Referências

- AHMADIAN, E. et al. Pre-Eclampsia: Microbiota possibly playing a role. **Pharmacological Research**, v. 155, p. 104692, 1 maio 2020.
- AMARAL, L. M. et al. Pathophysiology and Current Clinical Management of Preeclampsia. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 8, p. 1–6, 1 ago. 2017.
- AYDIN, S. et al. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 113, n. 1, p. 21–25, 15 mar. 2004.
- BAKER, P. N. et al. Mechanical stress eliminates the effects of plasma from patients with preeclampsia on endothelial cells. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 174, n. 2, p. 730–736, 1 fev. 1996.
- BARAUNA, V. G. et al. Shear stress-induced Ang II AT1 receptor activation: G-protein dependent and independent mechanisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 434, n. 3, p. 647–652, 10 maio 2013.
- BELL, M. J. A Historical Overview of Preeclampsia-Eclampsia. **Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing**, v. 39, n. 5, p. 510–518, 1 set. 2010.
- BERNARDI, F. C. et al. Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in the plasma and placenta from preeclamptic patients. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 713–719, 15 maio 2015.
- BRAUNERSREUTHER, V.; MACH, F. Leukocyte recruitment in atherosclerosis: Potential targets for therapeutic approaches? **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS** 2006 **63:18**, v. 63, n. 18, p. 2079–2088, 4 set. 2006.
- BURTON, G. J. et al. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. **BMJ**, v. 366, 15 jul. 2019.
- CALDEIRA-DIAS, M. et al. Preeclamptic plasma stimulates the expression of miRNAs, leading to a decrease in endothelin-1 production in endothelial cells. **Pregnancy Hypertension**, v. 12, p. 75–81, 1 abr. 2018.
- CALDEIRA-DIAS, M. et al. Resveratrol improves endothelial cell markers impaired by plasma incubation from women who subsequently develop preeclampsia. **Hypertension Research** 2019 **42:8**, v. 42, n. 8, p. 1166–1174, 6 mar. 2019.
- CALDEIRA-DIAS, M. et al. Resveratrol and grape juice: Effects on redox status and nitric oxide production of endothelial cells in in vitro preeclampsia model. **Pregnancy Hypertension**, v. 23, p. 205–210, 1 mar. 2021.
- CALICCHIO, R. et al. Preeclamptic plasma induces transcription modifications involving the AP-1 transcriptional regulator JDP2 in endothelial cells. **American Journal of Pathology**, v. 183, n. 6, p. 1993–2006, 1 dez. 2013.

- CHAU, K. et al. Progress in preeclampsia: the contribution of animal models. **Journal of Human Hypertension** **2021**, p. 1–6, 26 nov. 2021.
- CHAU, K.; HENNESSY, A.; MAKRIS, A. Placental growth factor and pre-eclampsia. **Journal of Human Hypertension** **2017** **31:12**, v. 31, n. 12, p. 782–786, 24 ago. 2017.
- CHESLEY, L. C. et al. Vascular reactivity to angiotensin II and norepinephrine in pregnant and nonpregnant women. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 91, n. 6, p. 837–842, 15 mar. 1965.
- CHUNG, E.; LEINWAND, L. A. Pregnancy as a cardiac stress model. **Cardiovascular research**, v. 101, n. 4, p. 561–570, 15 mar. 2014.
- CIPOLLA, M. J. Cerebrovascular function in pregnancy and eclampsia. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 14–24, 1 jul. 2007.
- CONRAD, K. P.; MILES, T. M.; BENYO, D. F. Circulating Levels of Immunoreactive Cytokines in Women with Preeclampsia. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 40, n. 2, p. 102–111, 1 ago. 1998.
- CURRY, F. E.; ADAMSON, R. H. Endothelial glycocalyx: Permeability barrier and mechanosensor. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 4, p. 828–839, 19 abr. 2012.
- DAHER, J. et al. Myeloperoxidase oxidized LDL Interferes with endothelial cell motility through miR-22 and heme oxygenase 1 Induction: Possible involvement in reendothelialization of vascular injuries. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.
- DAIBER, A.; CHLOPICKI, S. Revisiting pharmacology of oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: Evidence for redox-based therapies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 157, p. 15–37, 1 set. 2020.
- DAMSKY, C. H. et al. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. **Development**, v. 120, n. 12, p. 3657–3666, 1 dez. 1994.
- DAMSKY, C. H.; FITZGERALD, M. L.; FISHER, S. J. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 1, p. 210–222, 1 jan. 1992.
- DAVIDGE, S. T.; BAKER, P. N.; ROBERTS, J. M. NOS expression is increased in endothelial cells exposed to plasma from women with preeclampsia. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.3.H1106>, v. 269, n. 3 38-3, 1995.
- DEMOS, C.; TAMARGO, I.; JO, H. Biomechanical regulation of endothelial function in atherosclerosis. **Biomechanics of Coronary Atherosclerotic Plaque**, p. 3–47, 1 jan. 2021.
- DIEJOMAOH, F. M. E. et al. Nitric oxide production is not altered in preeclampsia. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 269, n. 4, p. 237–243, 2004.

DIMMELER, S. et al. Upregulation of Superoxide Dismutase and Nitric Oxide Synthase Mediates the Apoptosis-Suppressive Effects of Shear Stress on Endothelial Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, n. 3, p. 656–664, 1999.

DINIZ, A. L. D.; PAES, M. M. B. M.; DINIZ, A. D. Analyzing Preeclampsia as the Tip of the Iceberg Represented by Women with Long-Term Cardiovascular Disease, Atherosclerosis, and Inflammation. **Current Atherosclerosis Reports** 2020 **22:3**, v. 22, n. 3, p. 1–8, 19 fev. 2020.

DONKER, R. B. et al. Plasma Factors in Severe Early-Onset Preeclampsia Do Not Substantially Alter Endothelial Gene Expression In Vitro: <https://doi.org/10.1016/j.jsg.2004.10.014>, v. 12, n. 2, p. 98–106, 28 ago. 2016.

EGEA, J. et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). **Redox Biology**, v. 13, p. 94–162, 1 out. 2017.

ENGLISH, F. A. et al. Inhibition of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein-1 Receptor Protects Against Plasma-Mediated Vascular Dysfunction Associated With Pre-Eclampsia. **American Journal of Hypertension**, v. 26, n. 2, p. 279–286, 1 fev. 2013.

EUSER, A. G.; CIPOLLA, M. J. Cerebral blood flow autoregulation and edema formation during pregnancy in anesthetized rats. **Hypertension**, v. 49, n. 2, p. 334–340, 1 fev. 2007.

FAAS, M. M. et al. Plasma from preeclamptic women activates endothelial cells via monocyte activation in vitro. **Journal of reproductive immunology**, v. 87, n. 1–2, p. 28–38, dez. 2010.

FENG, S. et al. Mechanical activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  drives endothelial dysfunction at atheroprone sites. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 37, n. 11, p. 2087–2101, 2017.

FISHER, S. J.; DAMSKY, C. H. Human cytotrophoblast invasion. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, n. 3, p. 183–188, 1 jun. 1993.

GONZALEZ, M. A.; SELWYN, A. P. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. **The American Journal of Medicine**, v. 115, n. 8, p. 99–106, 8 dez. 2003.

GRUMMER, M. A. et al. Vascular endothelial growth factor acts through novel, pregnancy-enhanced receptor signalling pathways to stimulate endothelial nitric oxide synthase activity in uterine artery endothelial cells. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 2, p. 501–511, 15 jan. 2009.

GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature** **1986 320:6061**, v. 320, n. 6061, p. 454–456, 1986.

GUO, D.; CHIEN, S.; SHYY, J. Y. J. Regulation of endothelial cell cycle by laminar versus oscillatory flow: Distinct modes of interactions of AMP-activated protein kinase and akt pathways. **Circulation Research**, v. 100, n. 4, p. 564–571, 2 mar. 2007.

HASAN, S. S.; FISCHER, A. The Endothelium: An Active Regulator of Lipid and Glucose Homeostasis. **Trends in Cell Biology**, v. 31, n. 1, p. 37–49, 1 jan. 2021.

HAYBAR, H. et al. Involvement of circulating inflammatory factors in prognosis and risk of cardiovascular disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 132, p. 110–119, 1 jul. 2019.

HLADUNEWICH, M.; KARUMANCHI, S. A.; LAFAYETTE, R. A. Pathophysiology of the Clinical Manifestations of Preeclampsia. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 2, n. 3, p. 543–549, 1 maio 2007.

HUPPERTZ, B.; PEETERS, L. L. H. Vascular biology in implantation and placentation. **Angiogenesis**, v. 8, n. 2, p. 157–167, abr. 2005.

JI, L. et al. Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 5, p. 981–1023, 1 out. 2013.

JIANG, Y. Z. et al. Hemodynamic disturbed flow induces differential DNA methylation of endothelial Kruppel-like factor 4 promoter in vitro and in vivo. **Circulation Research**, v. 115, n. 1, p. 32–43, 20 jun. 2014.

JOVINGE, S. et al. Human Monocytes/Macrophages Release TNF- $\alpha$  in Response to Ox-LDL. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 16, n. 12, p. 1573–1579, 1996.

KALAFAT, E.; THILAGANATHAN, B. Cardiovascular origins of preeclampsia. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 29, n. 6, p. 383–389, 1 dez. 2017.

KNÖFLER, M.; POLLHEIMER, J. Human placental trophoblast invasion and differentiation: A particular focus on Wnt signaling. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. SEP, p. 190, 2013.

KOLOVETSIOU-KREINER, V. et al. Maternal cardiovascular and endothelial function from first trimester to postpartum. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0197748, 1 maio 2018.

KOMAROVA, Y. A. et al. Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. **Circulation Research**, v. 120, n. 1, p. 179–206, 6 jan. 2017.

LAM, C.; LIM, K. H.; KARUMANCHI, S. A. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. **Hypertension**, v. 46, n. 5, p. 1077–1085, 1 nov. 2005.

LAMARCA, B. Endothelial dysfunction; an important mediator in the Pathophysiology of Hypertension during Preeclampsia. **Minerva ginecologica**, v. 64, n. 4, p. 309, ago. 2012.

LEBRIN, F. et al. TGF- $\beta$  receptor function in the endothelium. **Cardiovascular Research**, v. 65, n. 3, p. 599–608, 15 fev. 2005.

LI, J. et al. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. **Nature** 2014 515:7526, v. 515, n. 7526, p. 279–282, 10 ago. 2014.

LI, L. et al. Tetrahydrobiopterin deficiency and nitric oxide synthase uncoupling contribute to atherosclerosis induced by disturbed flow. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 7, p. 1547–1554, jul. 2011.

LIBBY, P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 18, p. 2278–2289, 31 out. 2017.



- LIP, S. V. The effects of preeclampsia on the maternal cardiovascular system: Gene expression and its (epigenetic) regulation in experimental preeclamptic cardiovascular tissues and cells. 26 ago. 2020.
- LUIZON, M. R. et al. Antihypertensive therapy in pre-eclampsia: effects of plasma from nonresponsive patients on endothelial gene expression. <http://dx.doi.org/10.2217/pgs-2016-0033>, v. 17, n. 10, p. 1121–1127, 27 jun. 2016.
- LÜSCHER, T. F.; BARTON, M. Biology of the Endothelium. **Clinical Cardiology**, v. 20, n. S2, p. II–3, out. 1997.
- MA, J. et al. TGF- $\beta$ -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 260, 21 abr. 2020.
- MACK, J. J. et al. NOTCH1 is a mechanosensor in adult arteries. **Nature Communications** 2017 **8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–19, 20 nov. 2017.
- MACKENZIE, R. M. et al. Endothelial FOS expression and pre-eclampsia. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 119, n. 13, p. 1564–1571, 1 dez. 2012.
- MAHMOUD, M. M. et al. Shear stress induces endothelial-to-mesenchymal transition via the transcription factor Snail. **Scientific Reports** 2017 **7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 13 jun. 2017.
- MARTINEZ-FIERRO, M. L. et al. Current model systems for the study of preeclampsia. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 6, p. 576–585, 1 mar. 2018.
- Maternal mortality ratio (per 100 000 live births)**. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/26>>. Acesso em: 15 jun. 2022.
- MAYNARD, S. E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 5, p. 649–658, 1 mar. 2003.
- MCMASTER, M. T.; ZHOU, Y.; FISHER, S. J. Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. **Seminars in Nephrology**, v. 24, n. 6, p. 540–547, 1 nov. 2004.
- MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 1 mar. 2014.
- MOHAN, S.; MOHAN, N.; SPRAGUE, E. A. Differential activation of NF-kappa B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.2.C572>, v. 273, n. 2 42-2, 1997.
- MOONEN, J. R. A. J. et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is modulated by fluid shear stress. **Cardiovascular Research**, v. 108, n. 3, p. 377–386, 1 dez. 2015.
- MOTTA, C. T.; MOREIRA, M. R. O Brasil cumprirá o ODS 3.1 da Agenda 2030? Uma análise sobre a mortalidade materna, de 1996 a 2018. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 10, p. 4397–4409, 25 out. 2021.

- MUIJSERS, H. E. C. et al. Consider Preeclampsia as a First Cardiovascular Event. **Current Cardiovascular Risk Reports** 2019 13:7, v. 13, n. 7, p. 1–6, 8 jun. 2019.
- MULLER, W. A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 7–22, 23 jan. 2013.
- MURUGESAN, S. et al. Extracellular Vesicles From Women With Severe Preeclampsia Impair Vascular Endothelial Function. **Anesthesia and analgesia**, v. 134, n. 4, p. 713–723, 1 abr. 2022.
- MUTTER, W. P.; KARUMANCHI, S. A. Molecular mechanisms of preeclampsia. **Microvascular Research**, v. 75, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2008.
- NAVAB, M. et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 6, p. 2039–2046, 1 dez. 1991.
- OPICHKA, M. A. et al. Vascular Dysfunction in Preeclampsia. **Cells** 2021, Vol. 10, Page 3055, v. 10, n. 11, p. 3055, 6 nov. 2021.
- OSOL, G.; MANDALA, M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. **Physiology**, v. 24, n. 1, p. 58–71, fev. 2009.
- PAN, L. et al. Shear stress induces human aortic endothelial cell apoptosis via interleukin-1 receptor-associated kinase 2-induced endoplasmic reticulum stress. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 5, p. 7205–7212, 1 nov. 2017.
- PANDEY, A. K. et al. Mechanisms of VEGF (vascular endothelial growth factor) inhibitor-associated hypertension and vascular disease. **Hypertension**, v. 71, n. 2, p. E1–E8, 1 fev. 2018.
- PINHEIRO-DE-SOUSA, I. et al. Uncovering emergent phenotypes in endothelial cells by clustering of surrogates of cardiovascular risk factors. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.
- PLATT, M. O. et al. Expression of cathepsin K is regulated by shear stress in cultured endothelial cells and is increased in endothelium in human atherosclerosis. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 3, p. 1479–1486, mar. 2007.
- PLATT, M. O.; ANKENY, R. F.; JO, H. Laminar shear stress inhibits cathepsin L activity in endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 8, p. 1784–1790, 1 ago. 2006.
- POLLHEIMER, J. et al. Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, p. 2597, 13 nov. 2018.
- POREDOŠ, P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. **International Angiology**, v. 21, n. 2, p. 109–116, jun. 2002.
- RANA, S. et al. Preeclampsia. **Circulation Research**, v. 124, n. 7, p. 1094–1112, 29 mar. 2019.
- RIZOV, M.; ANDREEVA, P.; DIMOVA, I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 2, p. 127–132, 1 abr. 2017.

- ROBERTS, J. M. et al. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 161, n. 5, p. 1200–1204, 1 nov. 1989.
- ROBERTS, J. M.; HUBEL, C. A. The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. **Placenta**, v. 30, n. SUPPL., p. 32–37, 1 mar. 2009.
- ROCHA-PENHA, L. et al. Myeloperoxidase in Hypertensive Disorders of Pregnancy and Its Relation with Nitric Oxide. **Hypertension**, v. 69, n. 6, p. 1173–1180, 1 jun. 2017.
- ROMUNDSTAD, P. R. et al. Hypertension in pregnancy and later cardiovascular risk: Common antecedents? **Circulation**, v. 122, n. 6, p. 579–584, 10 ago. 2010.
- ROVINSKY, J. J.; JAFFIN, H. Cardiovascular hemodynamics in pregnancy: III. Cardiac rate, stroke volume, total peripheral resistance, and central blood volume in multiple pregnancy. Synthesis of results. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 95, n. 6, p. 787–794, 15 jul. 1966.
- SALEH, L. et al. The emerging role of endothelin-1 in the pathogenesis of pre-eclampsia. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 10, n. 5, p. 282–293, 1 out. 2016.
- SANDRIM, V. C. et al. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. **Hypertension**, v. 52, n. 2, p. 402–407, 1 ago. 2008.
- SANGHAVI, M.; RUTHERFORD, J. D. Cardiovascular physiology of pregnancy. **Circulation**, v. 130, n. 12, p. 1003–1008, 2014.
- SANKARALINGAM, S.; XU, H.; DAVIDGE, S. T. Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. **Cardiovascular Research**, v. 85, n. 1, p. 194–203, 1 jan. 2010.
- SAY, L. et al. Global causes of maternal death: A WHO systematic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 2, n. 6, p. e323–e333, 1 jun. 2014.
- SCHIFFRIN, E. L. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. **American Journal of Hypertension**, v. 14, n. S3, p. 83S–89S, 1 jun. 2001.
- SCHULZ, E. et al. Mitochondrial Redox Signaling: Interaction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species with Other Sources of Oxidative Stress. <https://home.liebertpub.com/ars>, v. 20, n. 2, p. 308–324, 7 jan. 2014.
- SHEN, M. et al. Comparison of risk factors and outcomes of gestational hypertension and pre-eclampsia. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175914, 1 abr. 2017.
- SILVER, R. K. et al. Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 175, n. 4, p. 1013–1017, 1 out. 1996.
- SLUIMER, J. C.; DAEMEN, M. J. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. **The Journal of Pathology**, v. 218, n. 1, p. 7–29, 1 maio 2009.

- SOUILHOL, C. et al. Endothelial–mesenchymal transition in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 565–577, 15 mar. 2018.
- SPRINGSTEAD, J. R. et al. Evidence for the importance of OxPAPC interaction with cysteines in regulating endothelial cell function. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 7, p. 1304–1315, 1 jul. 2012.
- SUN, Z. et al. Activation of GPR81 by lactate inhibits oscillatory shear stress-induced endothelial inflammation by activating the expression of KLF2. **IUBMB Life**, v. 71, n. 12, p. 2010–2019, 1 dez. 2019.
- TANGERÅS, L. H. et al. Distinct First Trimester Cytokine Profiles for Gestational Hypertension and Preeclampsia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 11, p. 2478–2485, 1 nov. 2015.
- TASHIE, W. et al. Altered bioavailability of nitric oxide and L-arginine is a key determinant of endothelial dysfunction in preeclampsia. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.
- TZIMA, E. et al. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 17, p. 4639–4647, 3 set. 2001.
- UNFPA et al. Trends in Maternal Mortality: 2000 to 2017 | UNFPA - United Nations Population Fund. **WHO, UNICEF, UNFPA, World Bank Group and the United Nations Population Division**, p. 104, 2019.
- URSCHEL, K. et al. Investigation of Wall Shear Stress in Cardiovascular Research and in Clinical Practice—From Bench to Bedside. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 5635**, v. 22, n. 11, p. 5635, 26 maio 2021.
- VAN DER HEIDEN, K. et al. Role of nuclear factor  $\kappa$ B in cardiovascular health and disease. **Clinical Science**, v. 118, n. 10, p. 593–605, 1 maio 2010.
- VEERBEEK, J. H. W. et al. Cardiovascular disease risk factors after early-onset preeclampsia, late-onset preeclampsia, and pregnancy-induced hypertension. **Hypertension**, v. 65, n. 3, p. 600–606, 4 mar. 2015.
- VIANA-MATTIOLI, S. et al. SIRT1-dependent effects of resveratrol and grape juice in an in vitro model of preeclampsia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110659, 1 nov. 2020.
- VRICELLA, L. K. Emerging understanding and measurement of plasma volume expansion in pregnancy. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. suppl\_6, p. 1620S-1625S, 1 dez. 2017.
- WALLACE, A. E. et al. Oxygen modulates human decidual natural killer cell surface receptor expression and interactions with trophoblasts. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 6, 1 dez. 2014.
- WALLUKAT, G. et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 7, p. 945–952, 1 abr. 1999.
- WELLINGS, R. P.; BROCKELSBY, J. C.; BAKER, P. N. Activation of endothelial cells by plasma from women with preeclampsia: differential effects on four endothelial cell types. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 5, n. 1, p. 31–37, jan. 1998.

XU, S. et al. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 3, p. 924–967, 1 jul. 2021.

YING, W.; CATOV, J. M.; OUYANG, P. Hypertensive disorders of pregnancy and future maternal cardiovascular risk. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 17, p. 9382, 1 set. 2018.

# **Conclusões Finais**

Considerando os resultados obtidos em nosso estudo, este trabalho pode elucidar que o efeito de todos os plasmas é influenciado pelo tipo de regime SS. Além disso o plasma de PE induz vias de disfunção endotelial no LSS, e exacerba a disfunção endotelial no OSS em HCAECs. A partir de dados de transcriptoma, identificamos vias moleculares envolvidas com a PE em pelo menos um dos dois regimes de SS, como as vias associadas a respostas inflamatórias, vias de estresse do reticulo endoplasmático e EndMT. Dessa forma, esses resultados possibilitaram a obtenção de novas informações e melhor compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que regulam a disfunção endotelial mediada por fatores circulantes no plasma de PE. Além disso, os dados apresentados poderão ser úteis para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em pesquisas futuras e nosso estudo poderá orientar pesquisas futuras e melhorar a obtenção de resultados, aproximando modelos *in vitro* com plasma de PE do *in vivo*.

## Atividades complementares

### *Estágio Nacional*

60 horas de estágio no laboratório de genética e cardiologia molecular do instituto do coração

### *Atividade em Docência*

Estágio docência de 30 horas na disciplina de farmacodinâmica (1º semestre de 2022) para o curso de Ciências Biomédicas com a Professora Valéria Sandrim.

### *Artigos publicados em periódicos*

NUNES, PRISCILA REZECK ; **MATTIOLI, SARAH VIANA** ; SANDRIM, VALERIA CRISTINA . NLRP3 Activation and Its Relationship to Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress: Implications for Preeclampsia and Pharmacological Interventions. *Cells*, v. 10, p. 2828, 2021.

BERTOZZI-MATHEUS, MARIANA ; BUENO-PEREIRA, THAINA OMIA ; **VIANA-MATTIOLI, SARAH** ; CARLSTRÖM, MATTIAS ; CAVALLI, RICARDO DE CARVALHO ; SANDRIM, VALERIA CRISTINA . Different profiles of circulating arginase 2 in subtypes of preeclampsia pregnant women. *CLINICAL BIOCHEMISTRY*, v. 92, p. 25-33, 2021.

LUIZON, MARCELO R. ; CONCEIÇÃO, IZABELA M. C. A. ; **VIANA-MATTIOLI, SARAH** ; CALDEIRA-DIAS, MAYARA ; CAVALLI, RICARDO C. ; SANDRIM, VALERIA C. . Circulating MicroRNAs in the Second Trimester From Pregnant Women Who Subsequently Developed Preeclampsia: Potential Candidates as Predictive Biomarkers and Pathway Analysis for Target Genes of miR-204-5p. *Frontiers in Physiology*, v. 12, p. 1, 2021.

CALDEIRA-DIAS, MAYARA ; **VIANA-MATTIOLI, SARAH** ; DE SOUZA RANGEL MACHADO, JACKELINE ; CARLSTRÖM, MATTIAS ; DE CARVALHO CAVALLI, RICARDO ; SANDRIM, VALÉRIA CRISTINA . Resveratrol and grape juice: Effects on redox status and nitric oxide production of endothelial cells in in vitro preeclampsia model. *Pregnancy Hypertension-An International Journal of Womens Cardiovascular Health*, v. 23, p. 205-210, 2021.

“Missing links in preeclampsia cell model systems of endothelial dysfunction”, **Sarah Viana-Mattioli**, Iguaracy Pinheiro-de-Sousa, Miriam Helena Fonseca-Alaniz, José Eduardo Krieger, Valéria Cristina Sandrim. (Accepted in *Cell-Trends in molecular medicine* on April 13th 2023)

### *Artigos submetidos*

“In silico network-based screening reveals candidates for endothelial dysfunction therapy”, Iguaracy Pinheiro-de-Sousa, Girolamo Giudice, Miriam Helena FonsecaAlaniz, Silvestre Massimo Modestia, **Sarah Viana Mattioli**, Yun Fang, Evangelia Petsalaki, Jose E. Krieger (Submitted to *Molecular Systems Biology* in November 2022)



“Low lead levels-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats are attenuated by sildenafil: evidence of pleiotropic antioxidant effects”, Ediléia Souza Paula Caetano, **Sarah Viana Mattioli**, Maria Luiza Santos da Silva, Laisla Zanetoni Martins, Alaor Aparecido Almeida, Ananda Lini Vieira da Rocha, Gabriela Palma Zochio, and Carlos Alan Dias Junior. (Submitted to Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology in February 2023)