

MONOGRAFIA

Aluno: Thiago Gameiro Zupelli

Curso: Ciências Biológicas - Bacharelado

Ação da vitamina D sobre a apoptose induzida por urato monossódico, peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral alfa em células endoteliais de linhagem - HUVEC

Tipo: Iniciação Científica

Orientadora: Prof.^a Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Co-orientadora: Dra. Mariana Romão Veiga

Departamento onde foi realizada: Ciências Químicas e Biológicas

Instituição: Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP

Setembro/2021

Thiago Gameiro Zupelli

Ação da vitamina D sobre a apoptose induzida por urato monossódico, peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral alfa em células endoteliais de linhagem – HUVEC

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Co-orientadora: Dra. Mariana Romão Veiga

Botucatu

2021

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

Zupelli, Thiago Gameiro.

Ação da vitamina D sobre a apoptose induzida por urato monossódico, peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral alfa em células endoteliais de linhagem - HUVEC / Thiago Gameiro Zupelli. - Botucatu, 2021

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Coorientador: Mariana Veiga Romão

Capes: 21102007

1. Vitamina D. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Apoptose. 4. Expressão gênica. 5. Citometria de fluxo. 6. Células endoteliais.

Palavras-chave: Apoptose; Citometria de fluxo; Expressão gênica; Pré-eclâmpsia; Vitamina D.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro e institucional, no processo nº 2020/05263-3.

À minha família, principalmente aos meus pais e minha irmã, que além de me proporcionarem a oportunidade estudar, desde pequeno, me incentivaram em cada passo e decisão tomado ao longo de todo caminho que percorri.

À minha parceira, que esteve ao meu lado desde o início do curso, me incentivou por todo esse percurso e sempre me auxiliou a extrair o melhor que eu pudesse ser, independente de qual fosse meu objetivo.

À minha orientadora, por me guiar ao longo da pesquisa e permitir que novas portas se abrissem, além de me ensinar tudo do zero, com uma notável paciência e carinho. À minha co-orientadora e colegas de laboratório, que além de auxiliar na pesquisa, proporcionaram um ambiente agradável no laboratório, permitindo sempre o máximo de aproveitamento para a execução da pesquisa.

A todos os professores do curso, verdadeiras fontes de inspiração para nossa profissão, além de nos transmitir seu conhecimento e pensamentos, ensinando não somente a base dos conhecimentos sobre Biologia, mas também mostrando todas as incríveis possibilidades que podemos ter seguindo esse caminho.

Aos meus colegas de classe, que além de passar por diversos obstáculos juntos, se tornaram verdadeiros amigos que além de colegas de profissão, serão pessoas importantes ao longo da vida toda.

SUMÁRIO

RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVO.....	13
3. MÉTODOS	13
3.1. CULTURA DE LINHAGEM CELULAR HUVEC.....	13
3.2. ANÁLISE DA APOPTOSE POR MEIO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO	14
3.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR.....	15
3.4. DETERMINAÇÕES DE CITOCINAS	16
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
4. RESULTADOS	16
4.1. VIABILIDADE, APOPTOSE E NECROSE EM HUVECS CULTIVADAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE H₂O₂, MSU E TNF-α.....	16
4.2. EXPRESSÃO GÊNICA DE IL-1β, IL-18 E VDR EM HUVECS	20
4.3. DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS EM SOBRENADANTES DAS HUVECS	23
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	29
7. REFERÊNCIAS	29

RESUMO

Introdução: Gestações complicadas por pré-eclâmpsia (PE) estão associadas com isquemia/hipóxia placentária, estresse oxidativo, hiperuricemia e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. Essas alterações fisiológicas podem desencadear morte celular por apoptose, um processo essencial para a manutenção da homeostase de tecidos humanos, incluindo o endotélio de vasos, sendo considerado um evento intermediário na geração de síndromes da gestação, como a PE. O desencadeamento da PE pode ser dependente da deficiência de fatores reguladores capazes de modular essa resposta inflamatória como a vitamina D (VD). Esse hormônio exerce efeitos sobre o sistema imune inato e adaptativo, gerando um "status" imune mais tolerogênico, particularmente por suas atividades reguladoras sobre a resposta inflamatória. **Objetivo:** O presente projeto teve como objetivo avaliar a ação imunomoduladora da vitamina D sobre a apoptose e produção de citocinas em células endoteliais derivadas de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), urato monossódico (MSU) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). **Métodos:** As HUVECs foram cultivadas na presença ou ausência de H_2O_2 , MSU e TNF- α e tratadas com VD por 4 e 24 horas. A presença de apoptose foi avaliada por citometria de fluxo pela detecção de anexina V e iodeto de propídeo após 24h de cultura com os estímulos. A expressão gênica de Interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-18 e receptor de vitamina D (VDR) pelas células HUVEC foi avaliada por qPCR após 4h de cultivo e, a expressão proteica de IL-1 β , IL-18 e TNF- α foi determinada após 24h de cultivo pela técnica de ELISA. Os resultados foram analisados empregando-se testes paramétricos, com nível de significância de 5%. **Resultados:** O tratamento das HUVECs com H_2O_2 , MSU e TNF- α reduziu a viabilidade e aumentou a apoptose e apoptose/necrose das células. Esses efeitos foram atenuados com a adição de VD às células tratadas com MSU e TNF- α . Aumento da expressão gênica de IL-1 β , IL-18 e VDR pelas HUVECs foi observado após o tratamento com H_2O_2 , de IL-1 β e IL-18 com MSU e de IL-1 β e VDR com TNF- α , enquanto a expressão proteica de IL-1 β , IL-18 e TNF- α foi significativamente maior após cultura das células com os três estímulos. O tratamento concomitante de MSU+VD e TNF- α +VD reduziu a produção de IL-1 β , IL-18 e TNF- α , enquanto o tratamento com H_2O_2 +VD reduziu apenas a produção de TNF- α . Em conjunto os resultados mostram que o estímulo das HUVECs com H_2O_2 , MSU e TNF- α induz ativação dessas células, resultando em apoptose e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, que foram atenuadas pelo tratamento com VD. A alta produção de TNF- α por essas células sugere o envolvimento dessa citocina na indução

de apoptose nas HUVECs. **Conclusão:** O tratamento in vitro de células endoteliais da veia umbilical humana com vitamina D mostra que esse pro-hormônio, por suas atividades imunomoduladoras, pode ser promissor para minimizar o processo inflamatório sistêmico e a disfunção endotelial, que ocorrem na pré-eclâmpsia.

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez que ocorre entre 2 a 8% das gestações, caracterizada como a principal causa de morbidade, mortalidade e parto prematuro. O diagnóstico clínico é realizado a partir da vigésima semana de gravidez ou nos primeiros dias após o parto, com base no desenvolvimento de hipertensão arterial ($PA \geq 140 \times 90\text{mmHg}$) associada ou não à proteinúria ($\geq 300\text{mg}/24\text{h}$) (ACOG, 2019). Por ser uma doença sistêmica, a PE inclui outras disfunções maternas, tais como: insuficiência renal, comprometimento hepático, complicações neurológicas ou hematológicas, disfunção útero-placentária ou restrição de crescimento fetal (Tranquilli et al., 2014; Mol et al., 2016).

Embora a causa exata da PE seja desconhecida por ser uma doença multifatorial, alguns estudos sugerem como causas potenciais a invasão trofoblástica inadequada das arteríolas espiraladas maternas, má adaptação imunológica e disfunção de células endoteliais (Redman & Sargent, 2005; Silasi et al., 2010; George & Granger, 2011).

Durante a placentação normal, as artérias espiraladas uterinas maternas são invadidas por células do trofoblasto extraviloso, resultando na remodelação desses vasos em vasos útero-placentários, que garantem uma adequada irrigação sanguínea da placenta e do feto. No entanto, em placentas de gestantes com PE não ocorre invasão adequada pelo trofoblasto, gerando defeitos na remodelação da artéria espiralada e causando má perfusão e isquemia placentárias (George & Granger, 2011; Afroze et al., 2016). Essas alterações podem causar lesões que levam ao estresse oxidativo, resposta inflamatória local e produção de detritos e fatores anti-angiogênicos pela placenta. Esses produtos se disseminam na circulação materna e são responsáveis pela resposta inflamatória que se inicia, em razão da invasão trofoblástica deficiente, capaz de lesar sistemicamente o endotélio (Shikanai et al., 2015). Assim, a

placenta parece desempenhar papel fundamental no desenvolvimento e fisiopatologia da PE (Redman & Sargent, 2005; Devisme et al., 2013).

O estresse oxidativo é uma característica marcante em gestações complicadas pela PE (Burton & Jauniaux, 2004; Myatt & Cui, 2004), por induzir morte celular do trofoblasto e consequentemente disfunção placentária (Li et al., 2019). Pode ainda ser resultante de lesão causada por hipoxia e reperfusão (Burton & Hung, 2003) e/ou deficiência das defesas antioxidantes (Perkins, 2006). Peraçoli et al. (2011) relataram que a PE é caracterizada por estresse oxidativo, representado por ativação endógena de monócitos de gestantes portadoras de PE, associada à produção elevada de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) por essas células. A isquemia e hipóxia, resultantes da invasão trofoblástica inadequada levam a um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias na placenta (Raghupathy, 2013). Assim, TNF- α e IL-1 β são altamente expressos e secretados nas placentas de mulheres com PE, provavelmente devido à hipóxia-reoxigenação causada por perfusão placentária intermitente (Hung et al., 2004). Essas citocinas pró-inflamatórias caem na circulação materna e podem atuar sobre o endotélio e leucócitos circulantes, amplificando a resposta inflamatória sistêmica na PE.

A placenta humana é uma fonte de moléculas angiogênicas, que desempenham papel importante na formação de vasos sanguíneos na interface materno-fetal (Pratt et al., 2015). Estudos sugerem que um desequilíbrio na produção e liberação de fatores pró e antiangiogênicos pela placenta contribui para a disfunção das células endoteliais sistêmicas na PE e são fatores importantes para a propagação da lesão endotelial (Levine et al., 2004; Maynard et al., 2008). Portanto, redução significativa dos fatores angiogênicos como fator de crescimento placentário (PlGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bem como aumento da produção de fatores antiangiogênicos solúveis, como endogлина (sEng) e o receptor solúvel tirosina-like do tipo 1 (sFlt-1) tanto na placenta como no soro das gestantes

com PE têm sido associados à patogênese da doença (Silasi et al., 2010; De Oliveira et al., 2011; Weel et al., 2016). Alguns autores sugerem que a PE é uma patologia gestacional caracterizada por disfunção endotelial generalizada, que é considerada a principal causa dirigida da PE (Maynard & Karumanchi, 2011; Wei et al., 2013; Burton et al., 2019).

Portanto, estudos utilizando agentes indutores de estresse oxidativo e apoptose, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), TNF- α e ácido úrico sobre células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) são importantes para conhecer o envolvimento do estresse oxidativo e processo inflamatório sistêmico na PE, que podem promover lesão e apoptose de células endoteliais nessa patologia.

A linhagem celular HUVEC, derivada de células endoteliais da veia umbilical humana é frequentemente utilizada em estudos de disfunção endotelial, reparo de vasos sanguíneos, angiogênese e apoptose (Munarin & Coulomb, 2015; Pan et al., 2016). Além disso, tem sido amplamente empregada como modelo para estudo de disfunção endotelial na PE (Hobson et al., 2016; Viana-Mattioli et al., 2020; Ji et al., 2021).

A apoptose é um mecanismo celular intrínseco que leva à auto-destruição celular, considerada essencial para a homeostase dos tecidos humanos. É um fenômeno fisiológico necessário na embriogênese, estresse celular e remoção de células lesadas, bem como para controlar a proliferação celular anormal em condições patológicas (Hockenbery, 1994). Esse processo celular é induzido por estímulos específicos e ocorre em células que participam de vias relevantes para o organismo (Thompson, 1995). Muitos aspectos da apoptose a distinguem da necrose. Entre eles, o mais importante é que na apoptose, a remoção celular depende de uma maquinaria interna da célula, enquanto na necrose é um processo acidental, estimulado por um evento externo não planejado. Um segundo ponto importante é que a apoptose segue um padrão morfológico muito característico, com condensação da heterocromatina nuclear em um crescente depósito na membrana nuclear e posteriormente,

em corpos densos individuais ou múltiplos, que são eliminados por células fagocíticas (Wyllie, 1993). A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando danos às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (Ziegler & Groscurth, 2004).

A morte celular por apoptose tem sido observada em vários estados fisiopatológicos como aterosclerose, angiogênese e remodelação vascular (Karsan & Harlan, 1996; Bennet, 1997). Alguns autores demonstraram que as células endoteliais também podem sofrer apoptose em doenças cardiovasculares como aterosclerose e em outras condições inflamatórias, podendo essa morte celular ser modulada por flavonoides com atividade anti-inflamatória (Gong et al., 2019; Chen et al., 2020).

A apoptose pode ser induzida em HUVECs por diferentes estímulos que induzem estresse oxidativo, tais como radicais livres produzidos durante a inflamação H_2O_2 e produção de citocinas inflamatórias como $TNF-\alpha$ (Chen et al., 2015; 2020; Jiang et al., 2020). A placenta gera espécies reativas de oxigênio, que podem contribuir para o estresse oxidativo observado na gravidez normal, mas que aumenta em gestações complicadas por PE (Myatt, 2010). Alguns estudos têm utilizado H_2O_2 como agente indutor de estresse oxidativo e apoptose em trofoblastos humanos (Mol et al., 2007). Em estudo recente, demonstramos que o tratamento de explantes placentários, obtidos de gestantes normotensas, com H_2O_2 induz a ativação do inflamassoma NLRP3 como consequência do estresse celular induzido e aumento da expressão de proteínas e genes da caspase-1 e citocinas pró-inflamatórias $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$, associados à menor produção de $IL-10$ (Nunes et al., 2018).

Níveis elevados de ácido úrico estão associados a casos mais graves de PE (Martin & Brown, 2010). Correlação positiva entre níveis plasmáticos elevados de ácido úrico e de

TNF- α , IL-1 β , IL-12 e da proteína de choque térmico Hsp70 foi observada em formas graves da PE (Peraçoli et al. 2013). Além disso, Matias et al. (2015) demonstraram que cristais de ácido úrico, representados por urato monossódico (MSU), induzem ativação do inflamassoma NLRP3 e aumento da produção de TNF- α por monócitos em gestantes pré-eclâmpticas. O tratamento de HUVECs com TNF- α induz apoptose e aumento da expressão de moléculas de adesão vasculares como ICAM-1, VCAM-1 e selectina-E, acompanhada da ativação das vias de sinalização mediadas pelos fatores de transcrição celulares NF- κ B e AP-1 (Chen et al., 2015). Essas evidências mostram que a resposta inflamatória sistêmica exacerbada e a disfunção endotelial, detectadas na PE, poderiam estar associadas à deficiência de fatores reguladores capazes de modular essa resposta inflamatória como, por exemplo, a vitamina D (VD).

A VD é um pró-hormônio multifuncional, obtido principalmente a partir da exposição à luz solar (Feldman et al., 2014). Esse hormônio pode ser adquirido pela dieta, mas sua principal fonte decorre da sua ativação na pele (derme e epiderme), a partir da exposição aos raios ultravioleta (UVB) (Prietl et al., 2013). A vitamina D exerce inúmeros efeitos no organismo. Tem sido considerada como importante agente imunomodulador dos sistemas imunes inato e adaptativo, por regular a proliferação, diferenciação celular e apoptose, bem como por apresentar atividades reguladoras sobre a resposta inflamatória (Karras et al., 2018). Durante a gestação normal a vitamina D é produzida por células trofoblásticas placentárias e da decídua humana, sendo responsável por um papel anti-inflamatório em vários órgãos, incluindo a placenta (Xu et al., 2014).

Relatos da literatura descrevem deficiência de vitamina D em gestantes portadoras de PE (Robinson et al., 2013; Xu et al., 2014; Mohaghegh et al., 2015) e associação entre essa deficiência e o risco de desenvolvimento de PE (Aghajafari et al., 2013; Bodnar et al., 2014), sugerindo que a suplementação da vitamina D pode proteger o organismo materno

por sua influência sobre a função vascular e modulação da resposta imune (Hyppönen et al., 2013). Outros estudos demonstraram que baixas concentrações de vitamina D apresentavam associação com diminuição de PIGF no soro, sugerindo que a insuficiência de vitamina D pode estar envolvida na disfunção endotelial associada à PE (Wei et al. (2013; Smith et al., 2015). A administração de vitamina D em modelo experimental de PE induzida por hipóxia, causada por redução da perfusão uteroplacentária em ratas levou à diminuição da mortalidade fetal, da pressão arterial, proteinúria e do estresse oxidativo na placenta, acompanhado por ativação de autofagia e atenuação da apoptose. Os resultados sugerem que a vitamina D desempenha papel benéfico no início da gestação e sua suplementação pode ser usada como um potencial agente protetor na PE (Tian et al., 2016).

Portanto, o emprego de ensaios in vitro com HUVEC, utilizando agentes indutores de estresse oxidativo e apoptose, como H₂O₂, MSU e TNF- α e tratamento das células com VD para poder contribuir para melhor conhecimento da ação da vitamina D na modulação da resposta inflamatória sistêmica e da disfunção endotelial na PE.

2. OBJETIVO

- Avaliar a ação imunomoduladora da vitamina D sobre a apoptose em linhagem celular de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) estimulada com urato monossódico (MSU), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e fator de necrose tumoral (TNF- α) e sua associação com a produção das citocinas IL-1 β , IL-18 e TNF- α .

3. MÉTODOS

3.1. CULTURA DE LINHAGEM CELULAR HUVEC

HUVECs C-003-5C (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mMol/L de L-Glutamina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em garrafas T de 75 cm² (Corning) a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. As células foram repicadas para a realização dos experimentos, no momento em que as células apresentaram aproximadamente 80% de confluência. Para os experimentos, as células foram incubadas em meio sem SFB, na presença ou ausência de H₂O₂ (100µM), MSU (50µg/mL), TNF-α (20 pg/mL) e VD (100nM) (Sigma-Aldrich).

3.2. ANÁLISE DA APOPTOSE POR MEIO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram ajustadas na concentração de 5×10^5 e foram cultivadas por 24h em placa de 24 poços na presença ou ausência de H₂O₂ (100µM), MSU (50µg/mL), TNF-α (20 pg/mL) e VD (100nM). Como controle positivo de morte, uma alíquota das células a 10^5 /mL foi mantida em banho-maria a 56°C por 20 min. Após a incubação, o sobrenadante foi recolhido com tripsina, juntamente com as células desprendidas, e centrifugados por 10 min a 1200 rpm. O pellet celular foi ressuspendido em 100 µl de PBS gelado e lavado por 30s a 10.000 rpm. Após a segunda lavagem, as células foram ressuspendidas em 100µL de tampão fornecido no kit específico, contendo cálcio e incubadas com anexina V à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, foram adicionados 2µL do tampão de anexina. Por fim, as células foram coradas com 4µL do marcador iodeto de propídio (PI) para a checagem de viabilidade e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences) com software FACSDiva (BD Biosciences). Os resultados foram analisados no software FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.). A anexina V é uma proteína que na presença de íons cálcio se liga à fosfatidilserina (PS) externalizada nos estágios iniciais de

apoptose, enquanto o PI é um intercalante de DNA e marca células em apoptose tardia e/ou necrose celulares.

3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

A quantificação da expressão gênica de IL-1 β , TNF- α , IL-18, TRAIL e VDR pelas HUVEC cultivadas na presença ou ausência de H₂O₂ (100 μ M), MSU (50 μ g/mL), TNF- α (20 pg/mL) e VD (100nM) por 4h foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA). O aparelho utilizado foi 7500 real-time PCR Systems (Applied Biosystems, USA).

As variantes dos alvos estudados foram alinhadas no programa MEGA 6 e posteriormente, cada iniciador foi escolhido por meio do programa Primer-BLAST. Para cada alvo, foram selecionados dois iniciadores, sendo que alguns estão localizados na junção éxon-éxon. Iniciadores presentes em tal junção garantem a pureza da reação, ou seja, a ausência de qualquer DNA genômico que possa contaminá-la. As sequências dos iniciadores utilizadas no presente estudo estão detalhadas no Quadro 1 abaixo:

Quadro 1. Sequências dos iniciadores para a análise da expressão dos genes em estudo por qPCR.

<u>Alvos</u>	Sequência (5'-3')	Comprimento do produto	Nome do gene	Acesso ao GenBank
<u>IL-1β</u>	Forward primer: (544)GAGCAACAAGTGGTGTCTCC(564) Reverse primer: (653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)	110 pb	IL1B	NM_000576.2
<u>IL-18</u>	Forward primer: (438)ACTGTAGAGATAATGCACCCCG(459) Reverse primer: (517)AGTTACAGCCATACCTCTAGGC(496)	80 pb	IL18	NM_001562.3
<u>TNF-α</u>	Forward primer: (325)GCTGCACTTTGGAGTGATCG(344)	138 pb	TNF	NM_000594.3

	Reverse primer: (462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)			
<u>VDR</u>	Forward primer: (590)TGGAGACTTTGACCGGAACG(609) Reverse primer: (704)GCTTCGCCTGAAGAAGCCT(686)	115 pb	VDR	NM_00101753 6.1
Controle interno da reação				
<u>GAPDH</u>	Forward primer: (684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703) Reverse primer: (801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	118 pb	GAPDH	NM_002046.4

Cada reação foi definida em duplicata no total de 20µl cada, o qual contém 0,3µM de cada iniciador (sense e anti-sense), 2µl de cDNA, 10µl de master mix e 6,8µl de água livre de nuclease. Adicionalmente, foi inserido um controle, também em duplicata, o qual foi incluído em cada reação a fim de provar que não haja contaminação. As condições para a reação de qPCR foram: desnaturação inicial a 96°C-10min, 40 ciclos a 95°C-15s e 60°C-60s, seguido de uma curva melting. A amplificação de cada transcrito específico foi confirmada pelo perfil da curva melting gerada no final de cada reação.

O cálculo da expressão diferencial dos genes selecionados foi efetuado pelo método de processamento de dados em relação a uma curva padrão (Larionov et al., 2005). Todas as condições e o controle negativo da reação (No template Control – NTC; sem DNA) foram analisadas em duplicatas. Para análise da expressão relativa, amostras de RNA obtidas das HUVEC (na ausência de estímulos) foram reunidas e após análise da expressão gênica, essa amostra recebeu o valor relativo de 100. Todas as outras amostras receberam valores relativos a essa amostra.

3.4. DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS

A concentração das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-18 em sobrenadantes de HUVEC obtidos após os tratamentos descritos no item 3.2. foram determinadas por kits de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os limites de sensibilidade do ensaio foram 1,0 pg/mL para IL-1 β , 1,6 pg/mL para TNF- α , 5,15 pg/mL para IL-18 e 2,86 pg/mL para TRAIL.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism, versão 6.01 (GraphPad, CA, EUA). A apoptose, expressão gênica e proteica foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. A significância estatística foi aceita em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. VIABILIDADE, APOPTOSE E NECROSE EM HUVECS CULTIVADAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE H₂O₂, MSU E TNF- α

As figuras 1, 2 e 3 representam a viabilidade celular das HUVECs cultivadas com os estímulos e tratadas com VD.

A figura 1 mostra os resultados do cultivo das HUVECs com H₂O₂ e VD. O tratamento com H₂O₂ resultou em diminuição significativa na viabilidade celular (figura 1A), e aumentou a apoptose em relação ao controle (figura 1B), assim como o índice apoptose/necrose (figura 1C). A Figura 1 (D-G) apresenta dotplots representativos do índice apoptose/necrose em HUVECs tratadas ou não com H₂O₂ e VD por 24 h.

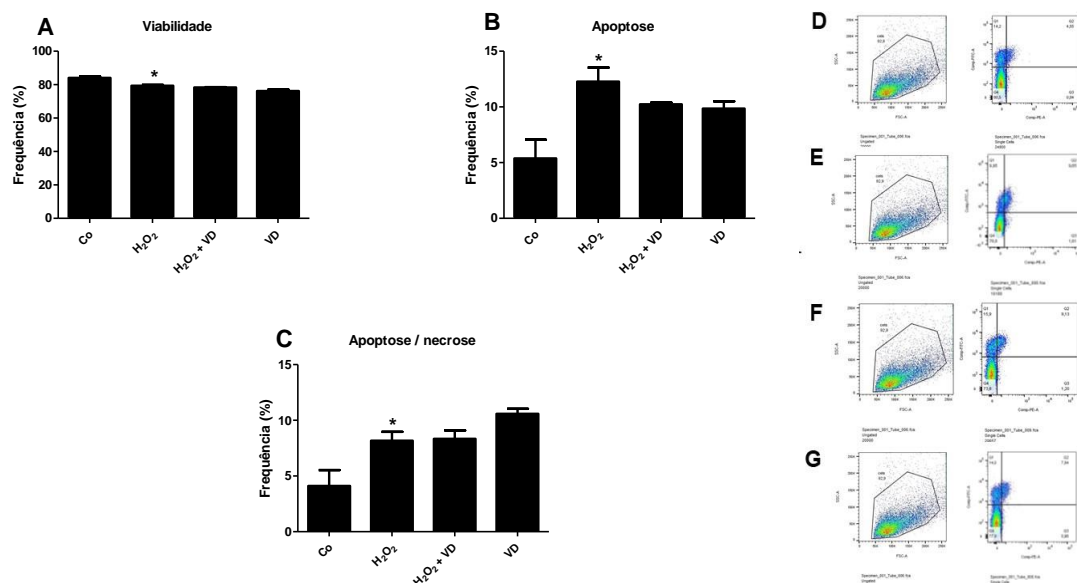


Figura 1. H₂O₂ aumenta a taxa de apoptose e apoptose/necrose em HUVECs (B-C). Índice apoptose/necrose representativo em HUVECs detectado por citometria de fluxo com Anexina V/PI (D-G). As amostras foram analisadas em três repetições técnicas e biológicas. Os resultados são expressos em média \pm SD. ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni. * ($p < 0,05$) vs Co.

O estímulo com MSU diminuiu a viabilidade celular das HUVECs em comparação com a cultura controle, enquanto o tratamento com MSU + VD mostrou manutenção da viabilidade celular (Figura 2A). Os índices de apoptose e apoptose/necrose aumentaram influenciados pelo tratamento com MSU e diminuíram com o cultivo concomitante de MSU + VD (Figura 2B e 2C). Na Figura 3 (D-F) observam-se *dotplots* representativos do índice apoptose/necrose em HUVECs tratadas ou não com MSU e VD por 24 h.

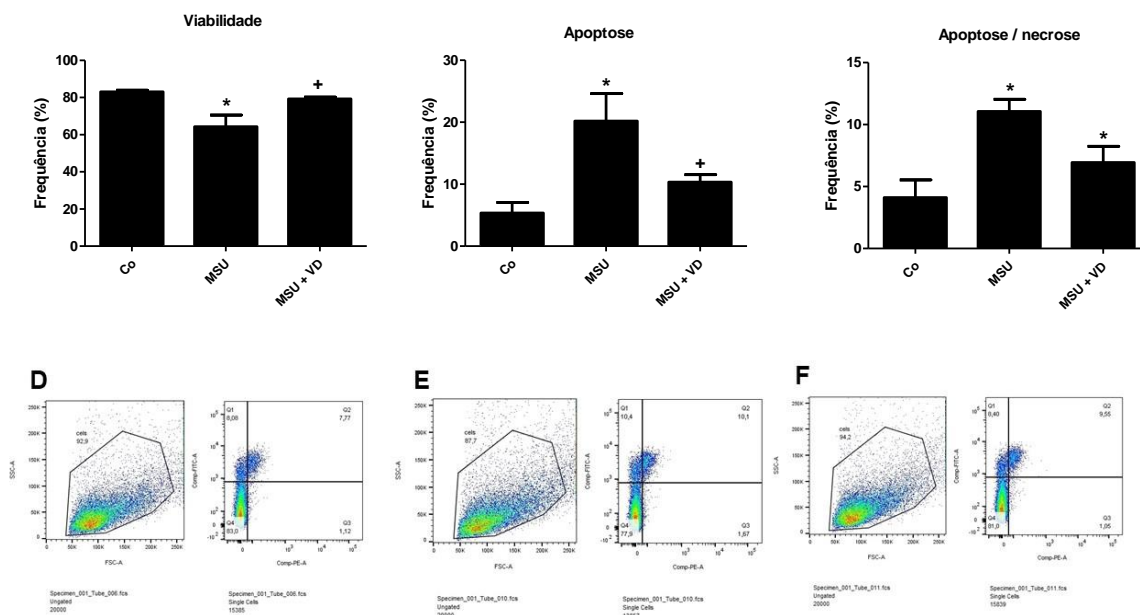


Figura 2. MSU reduz a viabilidade celular e aumenta a taxa de apoptose/necrose em HUVECs (A-C). Índice apoptose/necrose representativo em HUVECs detectado por citometria de fluxo com Anexina V/PI (D-F). As amostras foram analisadas em três repetições técnicas e biológicas. Os resultados são expressos em média \pm SD. ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. * ($p < 0,05$) vs Co, + ($p < 0,05$) vs MSU.

A viabilidade celular mostrada na figura 3 foi reduzida após o estímulo com TNF- α (Figura 3A) em comparação com a cultura controle, enquanto o tratamento com TNF- α + VD melhorou significativamente a viabilidade celular em comparação à cultura com TNF- α . Os índices de apoptose e necrose (Figura 3B e 3D) foram influenciados pelo tratamento com TNF- α e diminuíram com o tratamento concomitante de TNF- α + VD. A Figura 3C mostra a razão apoptose/necrose, que também aumentou com estímulo de TNF- α e diminuiu com tratamento de TNF- α + VD. A Figura 3 (E-H) apresenta *dotplots* representativos do índice apoptose/necrose em HUVECs tratadas ou não com TNF- α e VD por 24 h.

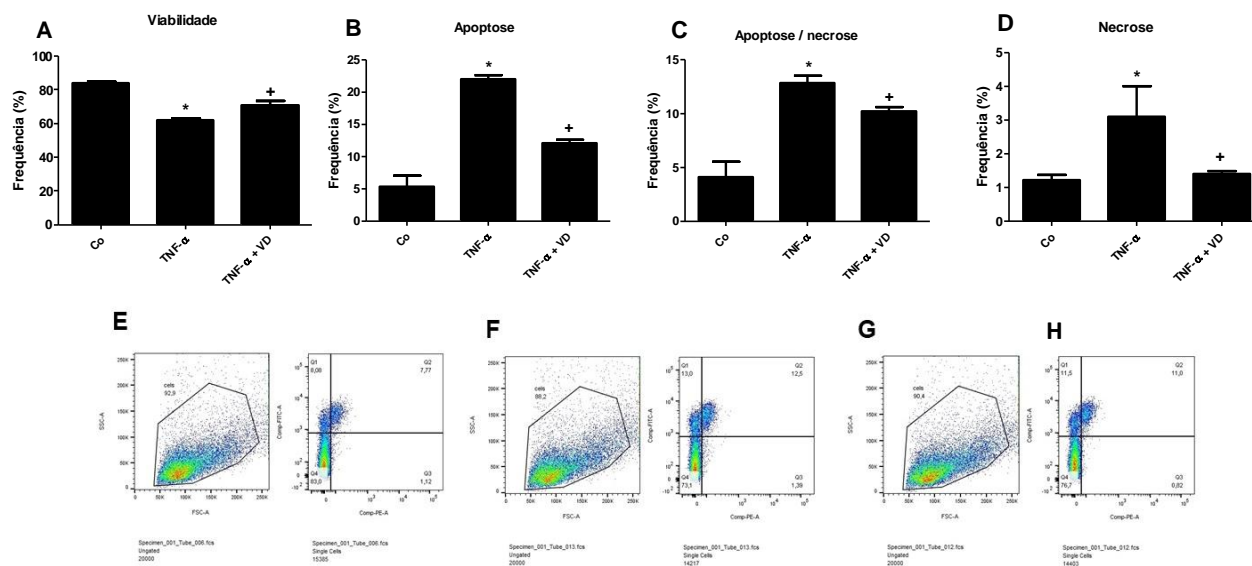


Figura 3. TNF- α reduz a viabilidade celular e aumenta a taxa de apoptose e necrose em HUVEC (A-D). Índice apoptose/necrose representativo em HUVEC detectado por citometria de fluxo com Anexina V/PI (E-G). As amostras foram analisadas em três repetições técnicas e biológicas. Os resultados são expressos como média \pm DP. ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. * ($p < 0,05$) vs Co, + ($p < 0,05$) vs TNF- α .

Em conjunto, os resultados mostram que os estímulos H₂O₂, MSU e TNF- α induziram aumento de apoptose e da razão apoptose/necrose nas células HUVEC. Além disso, observou-se que todos os estímulos diminuíram a viabilidade das HUVECs, enquanto o tratamento com VD aumentou a viabilidade e diminuiu a apoptose/necrose nas culturas tratadas com esses estímulos. Os tratamentos concomitantes de MSU + VD e TNF + VD levaram a diminuição significativa da apoptose induzida por esses estímulos. Entretanto, a adição de VD não reduziu a apoptose induzida por H₂O₂.

4.2. EXPRESSÃO GÊNICA DE IL-1 β , IL-18 E VDR EM HUVECs

O cultivo de HUVECs com H₂O₂ (figura 4) aumentou a expressão gênica de IL-1 β , IL-18 e VDR em comparação à cultura controle, não tratada. O tratamento concomitante de H₂O₂+VD reduziu significativamente os níveis de mRNA de IL-18 e VDR (figura 4B e C) em relação ao estímulo com H₂O₂, enquanto que o cultivo com VD reduziu a expressão de

IL-18 e VDR em relação ao controle. Embora o tratamento das células com H₂O₂ + VD tenha reduzido a expressão gênica de IL-1 β , essa redução não foi estatisticamente significativa em comparação com o tratamento com H₂O₂.

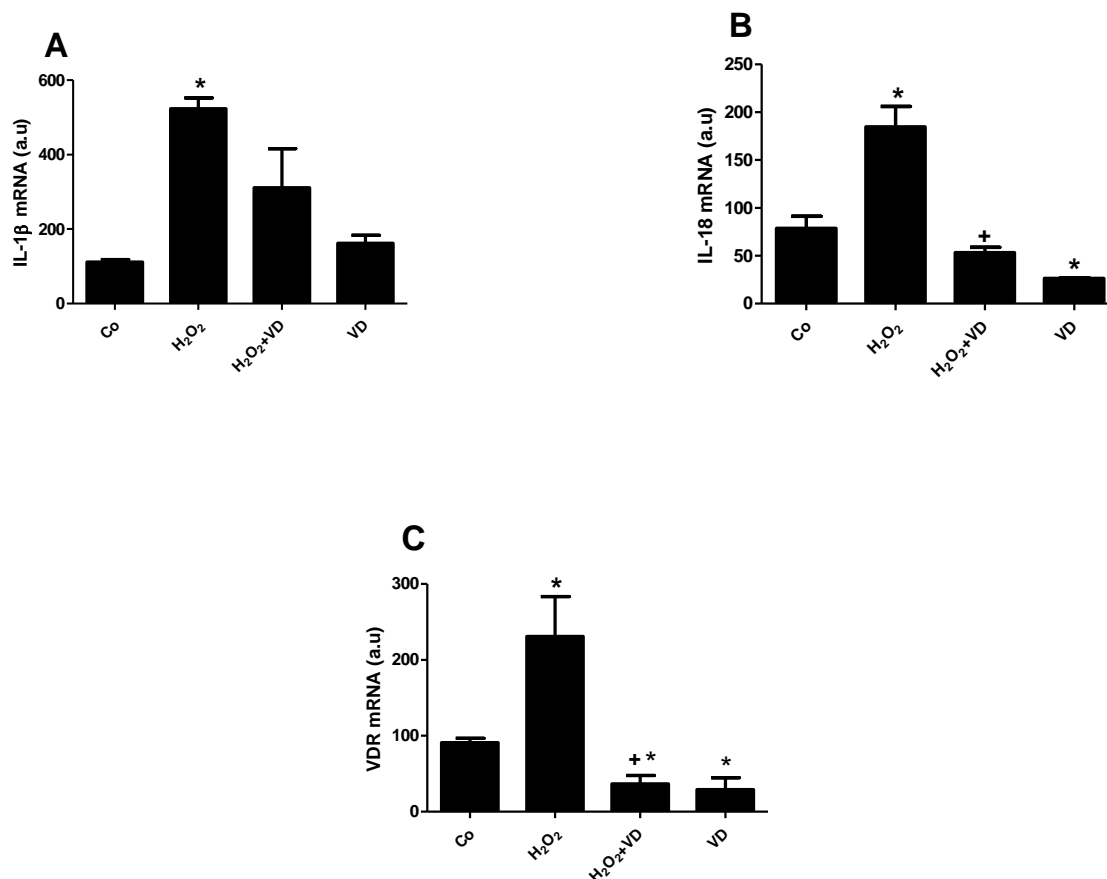


Figura 4. Expressão gênica de IL-1 β (A), IL-18 (B) e VDR (C) em HUVECs após tratamento na ausência ou presença de H₂O₂, VD e H₂O₂+VD. As amostras foram analisadas em três repetições técnicas e biológicas. Os resultados são expressos em média \pm SD. ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. *(p<0.05) vs. Co, +(p<0.05) vs. H₂O₂.

Da mesma forma, o cultivo com MSU (figura 5) aumentou significativamente a expressão gênica de IL-1 β e IL-18 em comparação à cultura controle, não tratada. O tratamento concomitante de MSU+VD causou diminuição significativa dos níveis de mRNA de IL-1 β e IL-18 (figura 5A e B), mas não alterou significativamente a expressão gênica de

VDR, embora os níveis de mRNA se apresentassem diminuídos em relação ao estímulo com MSU. A incubação com VD reduziu os níveis de mRNA para VDR em relação ao controle.

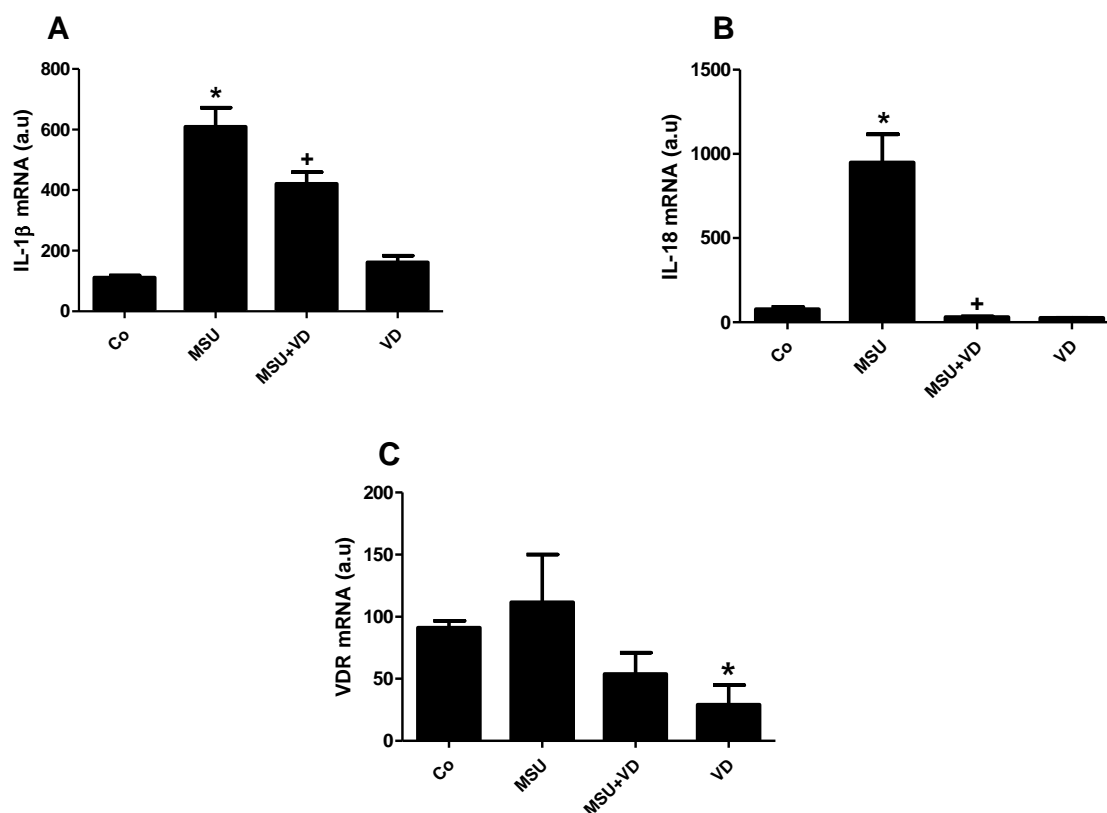


Figura 5. Expressão gênica de IL-1 β (A), IL-18 (B) e VDR (C) em HUVECs após tratamento na ausência ou presença de MSU, VD e MSU+VD. As amostras foram analisadas em três repetições técnicas e biológicas. Os resultados são expressos em média \pm SD. ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. *($p < 0.05$) vs. Co, +($p < 0.05$) vs. MSU.

A figura 6 mostra que o cultivo das HUVECs com TNF- α aumentou a expressão gênica de IL-1 β , IL-18 e VDR em comparação às células controle, não tratadas. O tratamento concomitante de TNF- α +VD diminuiu os níveis de RNA mensageiro de IL-18 e VDR (figura 6A e B), enquanto que para a expressão gênica de IL-1 β não foi encontrada diferença estatística entre esses grupos.

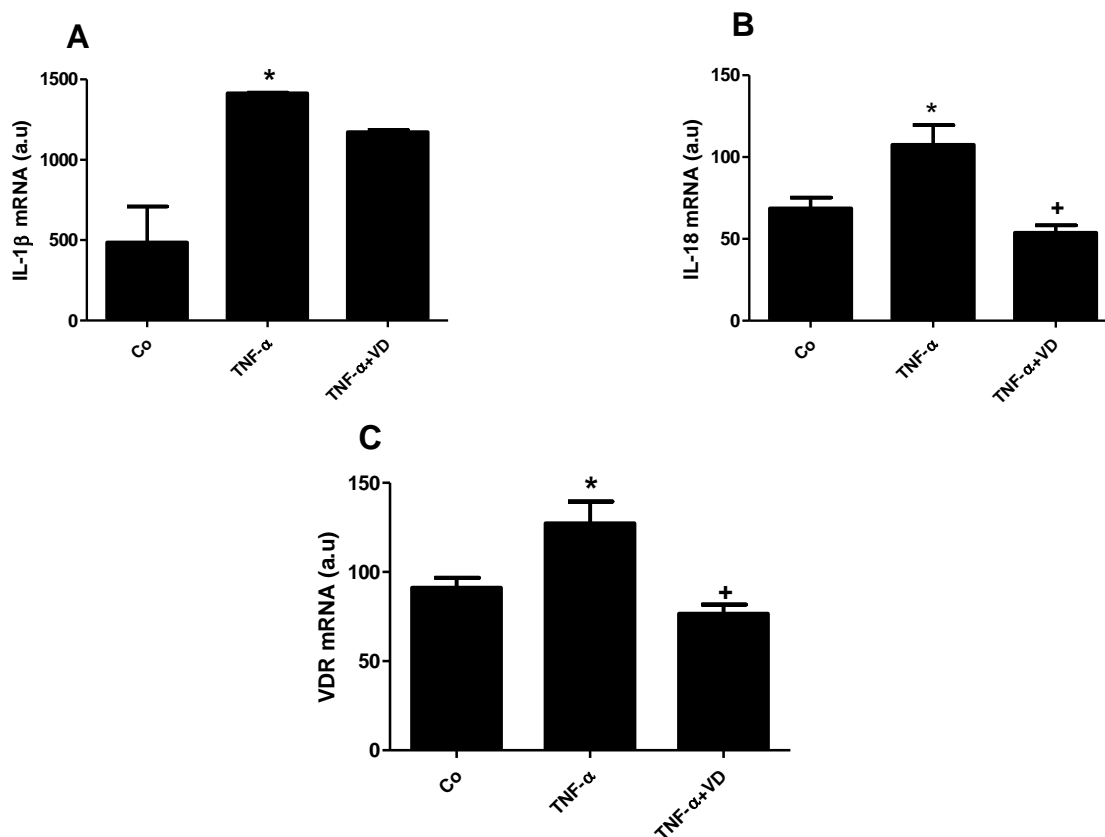


Figura 6. Expressão gênica de IL-1 β (A), IL-18 (B) e VDR (C) em HUVECs após tratamento na ausência ou presença de TNF- α e TNF- α +VD. As amostras foram analisadas em três repetições técnicas e biológicas. Os resultados são expressos em média \pm SD. ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. *($p < 0.05$) vs. Co, +(p<0.05) vs. TNF- α .

4.3. DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DAS HUVECs

Os níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-18 aumentaram significativamente quando as células foram estimuladas com H₂O₂ (figuras 7A, 7B e 7C), MSU (figuras 8A, 8B e 8C), e TNF- α (figuras 9A, 9B e 9C), em relação às células controle, não estimuladas. O tratamento concomitante das células com H₂O₂ +VC reduziu a produção de TNF- α , enquanto o

tratamento com MSU+VD e TNF- α +VD diminuiu as concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-18 produzidas.

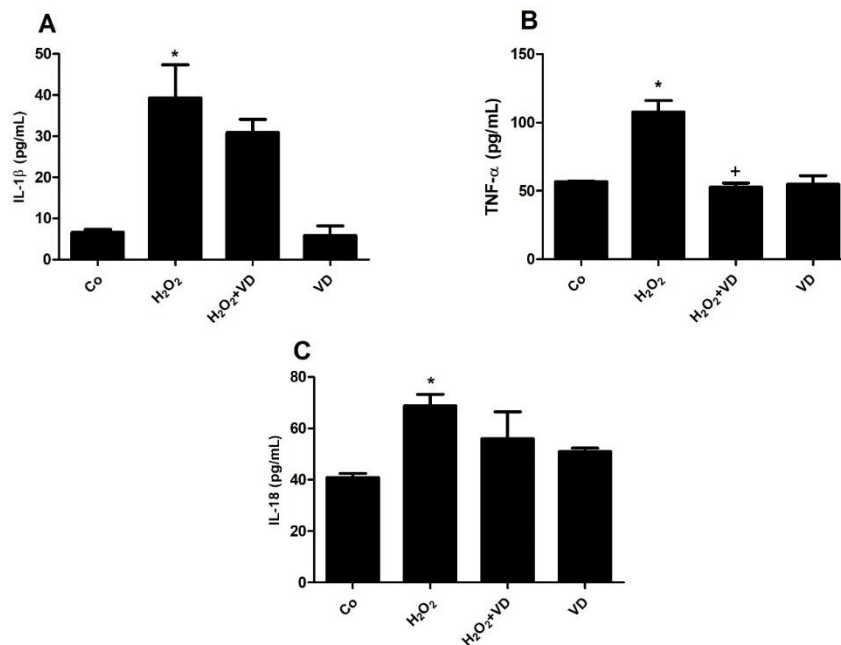


Figura 7. Níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-18 (C) em HUVECs após tratamento na ausência ou presença de H₂O₂, VD e H₂O₂+VD. As amostras foram analisadas em três repetições técnicas e biológicas. Os resultados são expressos em média \pm SD. ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. *(p<0.05) vs. Co, +(p<0.05) vs. H₂O₂.

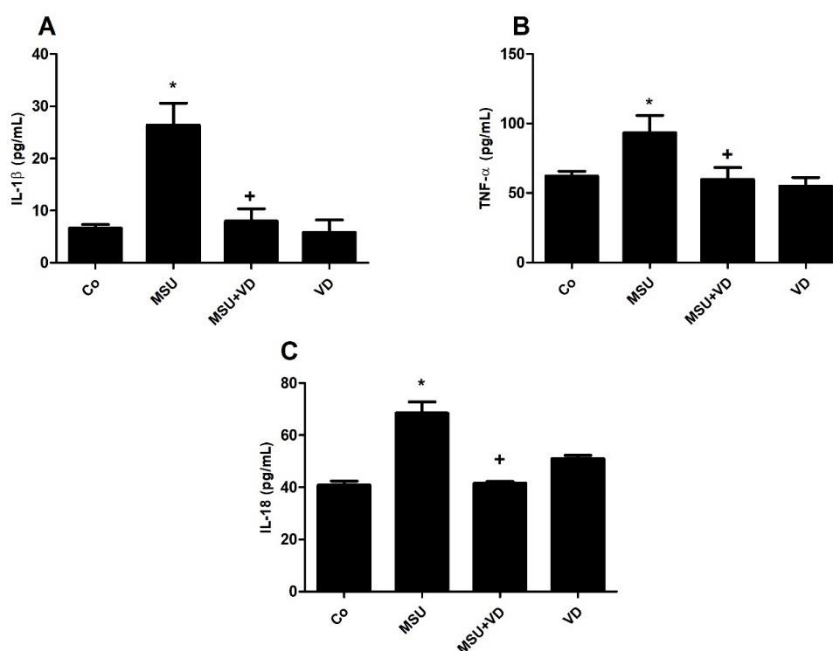


Figura 8. Níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-18 (C) em HUVECs após tratamento na ausência ou presença de MSU, VD e MSU+VD. As amostras foram analisadas em três repetições técnicas e biológicas. Os resultados são expressos em média \pm SD. ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. *($p < 0.05$) vs. Co, +(p<0.05) vs. MSU.

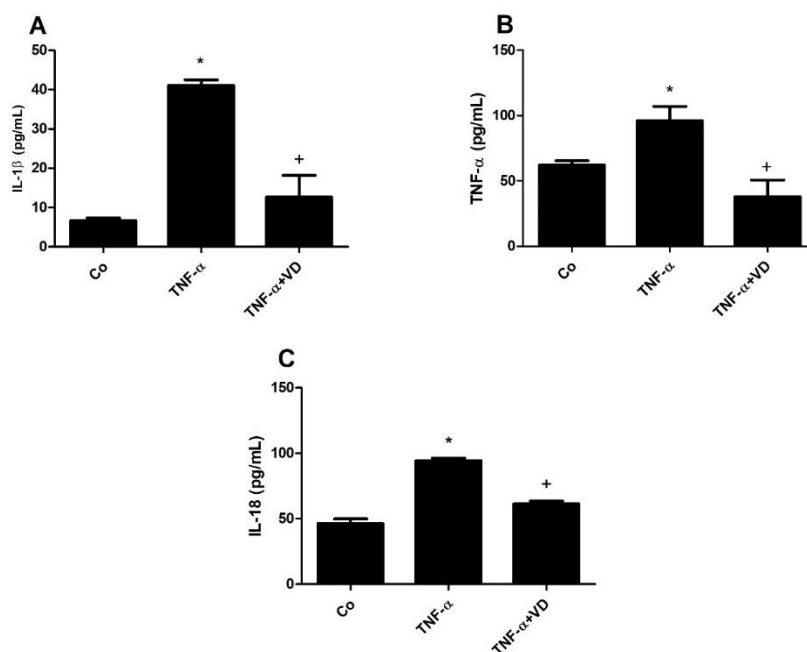


Figura 9. Níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-18 (C) em HUVECs após tratamento na ausência ou presença de TNF- α e TNF- α +VD. As amostras foram analisadas em três repetições técnicas e biológicas. Os resultados são expressos em média \pm SD. ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. *($p < 0.05$) vs. Co, +(p<0.05) vs. TNF- α .

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito imunomodulador da vitamina D (VD) sobre a apoptose e produção de citocinas inflamatórias em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). O emprego de células HUVEC para estudo dos efeitos de H₂O₂, MSU e TNF- α teve o objetivo de avaliar a ação do estresse oxidativo, da hiperuricemia e de citocinas pró-inflamatórias, que ocorrem em gestantes pré-eclâmpticas, sobre células endoteliais, como modelo in vitro de PE. Os resultados obtidos mostram que esses estímulos reduziram a viabilidade e aumentaram o índice de apoptose e apoptose/necrose nas HUVECs

e induziram ativação dessas células, resultando em elevada produção de citocinas inflamatórias. O tratamento das células com VD ou VD concomitante aos estímulos com H_2O_2 , MSU e TNF- α aumentou a viabilidade e diminuiu a apoptose/necrose nas culturas tratadas com MSU + VD e TNF + VD.

A apoptose pode ser induzida por diferentes estímulos que induzem estresse oxidativo na placenta, tais como radicais livres, produzidos durante a inflamação como H_2O_2 e citocinas inflamatórias. A placenta gera espécies reativas de oxigênio, que podem contribuir para aumento do estresse oxidativo e apoptose, observados em gestações complicadas por PE (Myatt, 2010; Mol et al., 2016). Tang et al. (2014) demonstraram que o tratamento com H_2O_2 diminuiu a viabilidade e desencadeou a apoptose em células JEG-3, linhagem semelhante a trofoblasto humano por mecanismos envolvendo as vias dependentes de mitocôndrias e JNK-p38 quinase.

Cristais de ácido úrico, representados por urato monossódico (MSU), uma das DAMPs (padrões moleculares associados ao dano) relacionadas ao estresse oxidativo, está associado ao aumento da produção de TNF- α por monócitos em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (Matias et al., 2015). Essa citocina pode causar a apoptose ou necrose de células tumorais, além de ser importante na regulação do desenvolvimento embrionário (Chu, 2013). O TNF- α desempenha tanto papel fisiológico como patológico na placenta e endométrio. Assim, pode desencadear homeostase do trofoblasto humano em concentrações fisiológicas, enquanto que produzido em concentrações elevadas pode causar efeitos adversos em patologias da gestação como aborto recorrente, PE e trabalho de parto prematuro (Haider & Knöfler, 2009; Peraçoli et al., 2013, Nunes et al., 2019). A concentração de TNF- α utilizada no presente trabalho, para estímulo das células HUVEC, foi correspondente à concentração plasmática média encontrada em gestantes portadoras de PE (Peraçoli et al., 2013; Nunes et al., 2019). Portanto, os resultados obtidos sugerem a capacidade dessa citocina em induzir

apoptose e disfunção das células endoteliais, enquanto o tratamento com VD associado ou não aos estímulos pode ser importante para minimizar os efeitos sistêmicos do TNF- α .

Brodowski et al. (2017) demonstraram que a função de HUVECs obtidas de cordão umbilical de recém-nascidos de gestantes portadoras de PE estava diminuída em comparação às gestantes normais, sugerindo que a disfunção placentária, detectada na PE, pode causar efeitos adversos no endotélio fetal. Embora os autores não tenham encontrado diferença significativa entre as gestantes normais e pré-eclâmpticas quanto as células endoteliais foram tratadas com VD, estudos anteriores do mesmo grupo mostraram melhora na migração, proliferação e formação de tubos por essas células, utilizando VD como modelo terapêutico (von Versen-Höynch et al., 2014; Brodowski et al., 2014; Lee et al., 2008). Tian et al. (2015) demonstraram que a administração de VD em ratas no início da prenhez, antes da indução da pré-eclâmpsia, melhora os efeitos deletérios placentários e os principais sintomas, e associaram esses desfechos positivos à inibição da apoptose nesses animais.

Os resultados referentes à expressão gênica mostram aumento significativo das citocinas e VDR em HUVECs quando cultivadas com os estímulos por H₂O₂, MSU e TNF- α . Levando-se em consideração a utilização de espécies reativas de oxigênio (H₂O₂) citocinas inflamatórias, como o TNF- α , e cristais de ácido úrico (MSU) para mimetizar o estresse oxidativo presente em gestações complicadas com PE, esses resultados estão de acordo com nossos estudos anteriores, mostrando aumento da expressão de marcadores inflamatórios em gestantes com PE (Matias et al., 2015; Nunes et al., 2018; Romão-Veiga et al., 2018).

O VDR é um receptor nuclear de 50 kDa, pertencente à família dos receptores esteróides de classe 2, semelhante aos receptores do ácido retinóico e do hormônio tireostimulante, possuindo um domínio ainda não bem definido para ligação com a 1,25(OH)₂D. A forma ativa da VD, 1,25(OH)₂D₃, ligada às proteínas transportadoras de VD do sangue, penetra na membrana celular e se liga ao VDR (DeLuca, 2004; Rostand &

Warnock, 2008). Os resultados do presente estudo mostraram maior expressão gênica de VDR, quando as células foram estimuladas com H_2O_2 e $TNF-\alpha$ e poderiam ser explicados pela alta produção do receptor, mostrando que esses estímulos são capazes de aumentar o estresse oxidativo e o estado inflamatório. Quando as HUVECs foram tratadas com VD, ou estimuladas e tratadas concomitantemente com VD, a expressão gênica de VDR diminuiu, provavelmente porque esse receptor pode interferir com a VD adicionada à cultura. Considerando que a avaliação do papel do VDR e a sinalização de vitamina D na gestação ainda são pouco conhecidos, mais estudos devem ser realizados para compreender sua participação na disfunção endotelial que ocorre na PE.

O tratamento das HUVECs com VD diminuiu significativamente a produção das citocinas inflamatórias nas células tratadas com esse hormônio, resultado que está de acordo com outros estudos *in vitro*, que mostram a influência da VD na regulação negativa das respostas imunes pró-inflamatórias (Hyppönen et al., 2013; Cyprian et al., 2019). Além disso, vários estudos na literatura sugerem que baixos níveis de VD durante a gestação estão associados ao risco de desenvolver PE e parto prematuro (Bodnar et al., 2014 ; Yuan et al., 2019; Pashapour et al., 2019). Assim, a associação entre a deficiência de vitamina D e o risco de desenvolvimento de PE (Aghajafari et al., 2013; Bodnar et al., 2014), sugerem que a suplementação da vitamina D pode proteger o organismo materno.

No presente estudo, observou-se que o tratamento das HUVECs com $TNF-\alpha$, além de diminuir a viabilidade e aumentar apoptose das células, induziu a produção de $IL-1\beta$, $IL-18$ e $TNF-\alpha$ por essas células. O $TNF-\alpha$ foi descrito como sendo capaz de induzir a apoptose em trofoblastos humanos e, em combinação com o interferon-gama ($IFN-\gamma$) estimula a apoptose em sincício e citotrofoblastos (Garcia-Lloret et al., 1996; Pijnenborg et al., 2000). Em revisão abordando alterações imunológicas maternas durante a PE, relacionadas a respostas citotóxicas alteradas, Barakonyi et al. (2014) concluíram que células da imunidade

inata estão alteradas tanto no sangue periférico como no útero, influenciando o resultado da gravidez. Assim, além da resposta inflamatória exagerada, os mecanismos apoptóticos relacionados ao efeito do TNF- α parecem estar envolvidos na patogênese da PE.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a intensa resposta inflamatória sistêmica que ocorre na PE, decorrente da ativação do inflamassoma NLRP3, com grande produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , tanto por células do sangue periférico como pela placenta em gestantes portadoras de PE (Matias et al., 2015; Matias et al., 2019; Weel et al., 2017) podem causar lesão em células endoteliais, induzindo apoptose. O tratamento in vitro das HUVECs com vitamina D, associada ou não aos estímulos empregados H₂O₂, MSU e TNF- α mostra que esse pro-hormônio, por suas atividades reguladoras sobre a resposta imune, pode ser promissor para minimizar o processo inflamatório sistêmico e a disfunção endotelial que ocorrem na PE.

7. REFERÊNCIAS

- Afroze SH, Kalagiri RR, Reyes M, Zimmerman JD, Beeram MR, Drever N, Zawieja DC, Kuehl TJ, Uddin MN. Apoptotic and stress signaling markers are augmented in preeclamptic placenta and umbilical cord. *BBA Clin.* 2016; 6:25-30.
- Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ.* 2013; 346:f1169.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. Clinical Management Guidelines for Obstetrician–Gynecologists. Acog practice bulletin number 202. Gestational hypertension and preeclampsia, *Obstet. Gynecol.* 2019; 133: e1-e25.
- Barakonyi A, Miko E, Szereday L, Polgar PD, Nemeth T, Szekeres-Bartho J, Engels GL. Cell death mechanisms and potentially cytotoxic natural immune cells in human pregnancies complicated by preeclampsia. *Reprod Sci.* 2014; 21:155-66.
- Bennett MR. Apoptosis in vascular disease, *Transplant. Immunol.* 1997; 5:184.
- Bodnar LM, Simhan HN, Catov JM, Roberts JM, Platt RW, Diesel JC, Klebanoff MA. Maternal vitamin D status and the risk of mild and severe preeclampsia. *Epidemiology* 2014; 25:207–14.
- Brodowski L, Burlakov J, Myerski AC, von Kaisenberg CS, Grundmann M, Hubel CA, von Versen-Höyneck F. Vitamin D prevents endothelial progenitor cell dysfunction induced

- by sera from women with preeclampsia or conditioned media from hypoxic placenta. *PLoS One* 2014; 9:e98527.
- Brodowski L, Burlakov J, Hass S, von Kaisenberg C, von Versen-Höyneck F Impaired functional capacity of fetal endothelial cells in preeclampsia. *PLoS ONE* 2017; 12: e0178340.
- Burton GJ, Hung TH. Hypoxia-reoxygenation: a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. *Fetal Mat Med Rev* 2003; 14:97-117.
- Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2004; 11:342-52.
- Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, Moffett A. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *BMJ.* 2019; 366:12381.
- Chen TL, Zhu GL, Wang JA, Zhang GD, Liu HF, Chen JR, Wang Y, He XL. Protective effects of isorhamnetin on apoptosis and inflammation in TNF-alpha-induced HUVECs injury. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8:2311-20.
- Chen T, Zhang X, Zhu G, Liu H, Chen J, Wang Y, He X. Quercetin inhibits TNF-alpha induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF-kB and AP-1 signaling pathway in vitro. *Medicine (Baltimore).* 2020; 99:e22241.
- Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* 2013; 328:222–5.
- Cyprian F, Lefkou E, Varoudi K, Girardi G. Immunomodulatory effects of vitamin D in pregnancy and beyond. *Front Immunol* 2019;10:2739.
- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition.* 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
- De Oliveira L, Câmara NO, Peraçoli JC, Peraçoli MT, Moron AF, Sass N. sFlt-1 and IP-10 in women with early-onset preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2011; 1:129-31.
- Devisme L, Merlot B, Ego A, Houfflin-Debarge V, Deruelle P, Subtil D. A case-control study of placental lesions associated with pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2013; 120:165–8.
- Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014; 14:342-57.
- Garcia-Lloret MI, Yui J, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. Epidermal growth factor inhibits cytokine-induced apoptosis of primary human trophoblasts. *J Cell Physiol.* 1996; 167:324-32.
- George EM, Granger JP. Mechanisms and potential therapies for preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2011; 13:269-75.
- Gong L, Lei Y, Liu Y, Tan F, Li S, Wang X, Xu M, Cai W, Du B, Xu F, Zhou Y, Han H, Sun H, Qiu L. Vaccarin prevents ox-LDL-induced HUVEC EndMT, inflammation and apoptosis by suppressing ROS/p38 MAPK signaling. *Am J Transl Res.* 2019; 11:2140-54.
- Haider S, Knöfler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* 2009; 30: 111–23.
- Hobson SR, Acharya R, Lim R, Chan ST, Mockler J, Wallace EM. Role of activin A in the pathogenesis of endothelial cell dysfunction in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2016; 6:130-3.
- Hockenbery DM. bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci Suppl.* 1994;18:51-5.
- Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *Am J Pathol* 2004; 164:1049–61.

- Hyppönen E, Cavadino A, Williams D, Fraser A, Vereczkey A, Fraser WD, Bánhidly F, Lawlor D, Czeizel AE. Vitamin D and pre-eclampsia: original data, systematic review and meta-analysis. *Ann Nutr Metab.* 2013; 63:331-40.
- Ji X, Li C, Lv Y, Miao Z, Wu L, Long W, Wang X, Ding H. A novel peptide ameliorates TNF α - and LPS-induced endothelial dysfunction in preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2021; doi: 10.1093/ajh/hpab086.
- Jiang F, Xu XR, Li WM, Xia K, Wang LF, Yang XC. Monotropein alleviates H₂O₂-induced inflammation, oxidative stress and apoptosis via NF- κ B/AP-1 signaling. *Mol Med Rep.* 2020; 22:4828-36.
- Karras SN, Wagner CL, Castracane VD. Understanding vitamin D metabolism in pregnancy: From physiology to pathophysiology and clinical outcomes. *Metabolism.* 2018; 86:112-23.
- Karsan A, Harlan JM. Modulation of endothelial cell apoptosis: Mechanisms and pathophysiological roles. *J Atheroscler. Thromb.* 1996; 3:75.
- Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 2005; 6:62.
- Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D Deficiency: An Important, Common, and Easily Treatable Cardiovascular Risk Factor? *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52:1949-56.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350:672–83.
- Li J, Tong C, Xu P, Wang L, Han TL, Wen L, Luo X, Tan B, Zhu F, Gui S, Gao R, Qi H, Baker PN. QSOX1 regulates trophoblastic apoptosis in preeclampsia through hydrogen peroxide production. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019; 32:3708-15.
- Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, Araújo JP Jr, Peraçoli JC, de Oliveira L, Peraçoli MT. Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in pregnant women with preeclampsia. *PLoS One* 2015;10: e0129095.
- Matias ML, Gomes VJ, Romão-Veiga M, Ribeiro VR, Nunes PR, Romagnoli GG, Peraçoli JC, Peraçoli MTS. Silibinin Downregulates the NF- κ B Pathway and NLRP1/NLRP3 Inflammasomes in Monocytes from Pregnant Women with Preeclampsia. *Molecules* 2019; 24:1548.
- Martin AC, Brown MA. Could uric acid have a pathogenic role in pre-eclampsia? *Nat Rev Nephrol.* 2010; 6:744–8.
- Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 2008; 59:61–78.
- Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol.* 2011; 31:33-46.
- Mohaghegh Z, Abedi P, Dilgouni T, Namvar F, Ruzafza S. The relation of preeclampsia and serum level of 25-hydroxyvitamin d in mothers and their neonates: a case control study in iran. *Horm Metab Res.* 2015; 47:284-8.
- Mol SJ, Jones CJ, Crocker IP, Baker PN, Heazell AE. Epidermal growth factor rescues trophoblast apoptosis induced by reactive oxygen species. *Apoptosis* 2007; 12:1611-22.
- Mol BW, Roberts CT, Thangaratnam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Preeclampsia. *Lancet* 2016; 387:999-1011.
- Munarin F, Coulombe KLK. A novel 3-dimensional approach for cardiac regeneration *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2015; 2015:1741-4.

- Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122:369-82.
- Myatt L. Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 2010; 31:S66-S69.
- Nunes PR, Peraçoli MTS, Romao-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Fernandes CJC, Peracoli JC, Rodrigues JR, De Oliveira L. Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress induces inflammasome activation in term human placental explants. *Pregnancy Hypertens.* 2018;14:29-36.
- Nunes PR, Romão-Veiga M, Peraçoli JC, Araujo Costa RA, de Oliveira LG, Borges VTM, Peraçoli MT. Downregulation of CD163 in monocytes and its soluble form in the plasma is associated with a pro-inflammatory profile in pregnant women with preeclampsia. *Immunol Res.* 2019; 67:194-201.
- Pan C, Xing JH, Zhang C, Zhang YM, Zhang LT, Wei SJ. Aldehyde dehydrogenase 2 inhibits inflammatory response And regulates atherosclerotic plaque, *Oncotarget.* 4: 35562-76.
- Pashapour S, Golmohammadlou S, Behroozi-Lak T, Ghasemnejad-Berenji H, Sadeghpour S, Ghasemnejad-Berenji M. Relationship between low maternal vitamin D status and the risk of severe preeclampsia: a case control study. *Pregnancy Hypertens.* 2019; 15:161-5.
- Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66:460-7.
- Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2013; 100:129-34.
- Perkins AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006; 46:77-83.
- Pijnenborg R, Luyten C, Vercruyssen L, Keith JC Jr, Van Assche FA. Cytotoxic effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha and interferon-gamma on cultured human trophoblast are modulated by fibronectin. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6:635-41.
- Pratt A, Da Silva Costa F, Borg AJ, Kalionis B, Keogh R, Murthi P. Placenta-derived angiogenic proteins and their contribution to the pathogenesis of preeclampsia. *Angiogenesis* 2015; 18:115–23.
- Priehl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients.* 2013; 5:2502-21.
- Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013; 22:8–19.
- Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005; 308:1592-4.
- Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, Baatz JE, Johnson DD. Association of maternal vitamin D and placenta growth factor with the diagnosis of early onset severe preeclampsia. *Am J Perinatol.* 2013; 30:167-72.

- Romao-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Nunes PR, M Borges VT, Peraçoli JC, Peraçoli MTS. Induction of systemic inflammation by hyaluronan and hsp70 in women with pre-eclampsia. *Cytokine* 2018; 105:23-31.
- Rostand SG, Warnock DG. Introduction to Vitamin D Symposium, March 14, 2008. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*. 2008; 3:1534.
- Shikanai S, Paula JCR, Leite HV, Cabral ACV, Brandão AHF. Endothelial dysfunction as a pathological link between pre-eclampsia and gestational mellitus diabetes. *Femina*. 2015; 43:89-92.
- Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2010; 37:239–53.
- Smith TA, Kirkpatrick DR, Kovilam O, Agrawal DK. Immunomodulatory role of vitamin D in the pathogenesis of preeclampsia. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11:1055-63.
- Sokolov DI, Kolobov AV, Lesnichija MV, Kostiouchek IN, Stepanova OI, Kvetnoy IM, Selkov SA. Regulatory mechanisms for apoptosis in placental tissue during normal pregnancy and gestosis-complicated pregnancy. *Bull Exp Biol Med*. 2009; 148:766-70.
- Tang C, Liang J, Qian J, Jin L, Du M, Li M, Li D. Opposing role of JNK-p38 kinase and ERK1/2 in hydrogen peroxide-induced oxidative damage of human trophoblast-like JEG-3 cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7:959-68.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267:1456-62.
- Tian X, Ma S, Wang Y, Hou L, Shi Y, Yao M, Wang X, Zhang H, Jiang L. Effects of Placental Ischemia Are Attenuated by 1,25-Dihydroxyvitamin D Treatment and Associated with Reduced Apoptosis and Increased Autophagy. *DNA and Cell Biol*. 2015; 35:536-41.
- Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens*. 2014; 4:97-104.
- Vianna-Mattioli S, Nunes P, Cavalli R, Sandrim V. Analysis of SIRT1 expression in plasma and in na in vitro model of preeclampsia. *Oxid Med Cell Longev*. 2020; 2020:4561083.
- von Versen-Höynck F, Brodowski L, Dechend R, Myerski AC, Hubel CA. Vitamin D antagonizes negative effects of preeclampsia on fetal endothelial colony forming cell number and function. *PLoS One* 2014; 9:e98990.
- Weel IC, Baergen RN, Romão-Veiga M, Borges VT, Ribeiro VR, Witkin SS, Bannwart-Castro C, Peraçoli JC, De Oliveira L, Peraçoli MT. Association between Placental Lesions, Cytokines and Angiogenic Factors in Pregnant Women with Preeclampsia. *PLoS One*. 2016; 11:e0157584.
- Weel IC, Romão-Veiga M, Matias ML, Fioratti EV, Peraçoli JC, Borges VTM, Jr.Araujo JP, Peraçoli MTS. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2017; 123:40-7.
- Wei SQ, Audibert F, Luo ZC, Nuyt AM, Masse B, Julien P, Fraser WD; MIROS Study Group. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D levels, angiogenic factors, and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2013; 208: 390.e1-6.

- Wyllie H.A. Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer*. 1993; 67: 205–8.
- Xu L, Lee M, Jeyabalan A, Roberts JM. The relationship of hypovitaminosis D and IL-6 in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2014; 210:149.e1-7.
- Yuan Y, Tai W, Xu P, Fu Z, Wang X, Long W, Guo X, Ji C, Zhang L, Zhang Y, Wen J. Association of maternal serum 25-hydroxyvitamin D concentrations with risk of preeclampsia: a nested case-control study and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019; 17:1-10.
- Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004; 19:124-8.