

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Ana Cristina dos Santos Lopes

**INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS/BIOQUÍMICOS NA PRÉ-
ECLÂMPSIA**

Belo Horizonte

2024

Ana Cristina dos Santos Lopes

**INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS/BIOQUÍMICOS NA PRÉ-
ECLÂMPSIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do grau de Doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof^a Dra. Patrícia Nessralla Alpoim

Coorientadora: Prof^a Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse

Belo Horizonte

2024

L864i Lopes, Ana Cristina dos Santos.
Investigação de marcadores genético/bioquímicos na pré-eclâmpsia
[recurso eletrônico] / Ana Cristina dos Santos Lopes. – 2024.
1 recurso eletrônico (351 f. : il.) : pdf

Orientadora: Patrícia Nessralla Alpoim.
Coorientadora: Luci Maria Sant'Ana Dusse.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises
Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Pré-eclâmpsia – Teses. 2. Polimorfismo (Genética) – Teses. 3.
Marcadores genéticos – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. I.
Alpoim, Patrícia Nessralla. II. Dusse, Luci Maria Sant'Ana. III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV.
Título.

CDD: 618.3



FOLHA DE APROVAÇÃO

INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS/BIOQUÍMICOS NA
PRÉ-ECLÂMPSIA

ANA CRISTINA DOS SANTOS LOPES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 17 de setembro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Patricia Nessler Alpoim

Profa. Patricia Nessler Alpoim - Orientadora
UFMG

Luci Maria Sant'Ana Dusse

Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse - Coorientadora
UFMG

Sarah Abreu Coxir

Profa. Sarah Abreu Coxir
FUMEC

Marcelo Rizzatti Luzon

Prof. Marcelo Rizzatti Luzon
UFMG

Jussara de Souza Mayrink Novais

Profa. Jussara de Souza Mayrink Novais
UFMG

Maria Leticia Firpe Penna

Profa. Maria Leticia Firpe Penna
Laboratório Códon Biotecnologia

Belo Horizonte, 17 de setembro de 2024.

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença específica da gravidez caracterizada pelo novo aparecimento de hipertensão acompanhada de proteinúria e/ou outros sinais de disfunção de órgãos maternos, que se manifesta após 20 semanas de gestação. MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes (19–25 nucleotídeos) que funcionam na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Muitos estudos sugeriram que diferentes perfis de expressão de microRNA podem estar associados ao desenvolvimento de PE. Portanto, este estudo tem como objetivo relatar, através de uma revisão sistemática, microRNAs diferencialmente expressos que podem estar associados à ocorrência da PE e se diferentes perfis de expressão de microRNA podem estar associados a diferentes classificações de PE, bem como a diferentes fases da gravidez. Outros marcadores genéticos e bioquímicos avaliados no presente estudo foram: polimorfismos nos genes *DDAH2*, *ECA* e *ESR1* e níveis plasmáticos de endocan. Devido à impossibilidade de realizar a coleta de amostras biológicas de gestantes durante a pandemia de COVID-19, a avaliação dos microRNAs envolvidos na PE foi conduzida por meio de uma revisão sistemática. O presente trabalho resultou na redação de quatro artigos, sendo três deles já publicados e um submetido. Este estudo servirá de referência para orientar futuras pesquisas experimentais. Além disso, o conhecimento dos perfis de expressão de microRNAs associados à PE pode auxiliar no desenvolvimento de novos protocolos para predição precoce da doença.

Palavras-chave: pré-eclâmpsia; biomarcadores; microRNAs; polimorfismos; endocan; *DDAH2*.

ABSTRACT

Pre-eclampsia (PE) is a pregnancy-specific disease characterized by new symptoms of hypertension accompanied by proteinuria and/or other signs of maternal organ dysfunction, which manifest after 20 weeks of gestation. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs (19–25 nucleotides) that function in post-transcriptional regulation of gene expression. Many studies have suggested that different microRNA expression profiles may be associated with the development of PE. Therefore, this study aims to report, through a systematic review, differentially expressed microRNAs that may be associated with the occurrence of PE and whether different microRNA expression profiles may be associated with different classifications of PE, as well as different stages of pregnancy. Other genetic and biochemical marks evaluated in the present study were: polymorphisms in the *DDAH2*, *ACE* and *ESR1* genes and endocan plasma levels. Due to the impossibility of collecting biological samples from pregnant women during the COVID-19 pandemic, the evaluation of microRNAs involved in PE was conducted through a systematic review. This work resulted in four articles, three of which have already been published and one submitted. This study will serve as a reference to guide future experimental research. Furthermore, knowledge of the expression profiles of microRNAs associated with PE can help in the development of new protocols for early prediction of the disease.

Keywords: preeclampsia; biomarkers, microRNAs; polymorphisms; endocan; DDAH2.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Exemplo de fluxograma	55
Figura 2 – Exemplo de informações básicas de um gráfico de floresta ou “ <i>forest plot</i> ”	61
Figura 3 – Exemplo de funnel plot ou gráfico de funil	65
Figura 4 - Biossíntese de miRNA	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA	9
1.1 OBJETIVOS	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 PRÉ-ECLÂMPسيا	14
2.1.1 Placentação e resposta inflamatória sistêmica em gestações normais	15
2.1.2 Etiopatogenia	16
2.1.3 Apresentação clínica da pré-eclâmpسيا: sinais e sintomas	17
2.1.4 Classificações da pré-eclâmpسيا	18
2.1.5 Fatores de risco	20
2.1.6 Patogênese e Fisiopatologia	25
2.2 REVISÃO SISTEMÁTICA	46
2.2.1 Protocolo de pesquisa	48
2.2.2 Pesquisa bibliográfica	50
2.2.3 Seleção de estudos primários	52
2.2.4 Avaliação da qualidade metodológica	55
2.2.5 Extração de dados	56
2.2.6 Síntese de dados	57
2.3 META-ANÁLISE	59
2.3.1 Desenvolvimento da meta-análise	60
2.3.2 Avaliação da heterogeneidade	62
2.3.3 Análise de subgrupos	63
2.3.4 Análise de sensibilidade	63
2.3.5 Viés de publicação	64
2.3.6 Avaliação da qualidade da evidência	66
2.3.7 Revisão sistemática neste estudo	67
2.4 MicroRNAs (miRNAs)	68
2.4.1 Nomenclatura dos miRNAs	70

2.4.2 Biogênese dos miRNAs	71
2.4.3 Mecanismo de ação dos miRNAs	75
2.4.4 Revisões sistemáticas na literatura	77
2.4.5 Revisões sistemáticas sobre a associação entre microRNAs e pré-eclâmpsia.....	79
2.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS NA PRÉ-ECLÂMPسيا.....	83
2.5.1 Óxido nítrico, ADMA e <i>DDAH2</i>	83
2.5.2 <i>ECA</i>	85
2.5.3 <i>ESR1</i>	87
2.5.4 Endocan.....	90
3 METODOLOGIA.....	92
3.1 microRNA	92
3.2 ADMA E <i>DDAH2</i>	95
3.3 POLIMORFISMOS <i>ACE</i> E <i>ESR1</i>	99
3.4 ENDOCAN	101
4 RESULTADOS	102
ARTIGO 1 - Changes in microRNA expression associated with preeclampsia: a systematic review.....	103
ARTIGO 2 - Early and late-onset preeclampsia: effects of <i>DDAH2</i> polymorphisms on ADMA levels and association with <i>DDAH2</i> haplotypes.....	155
ARTIGO 3 - Association among <i>ACE</i> , <i>ESR1</i> polymorphisms and preeclampsia in Brazilian pregnant women.....	162
ARTIGO 4 - Are endocan plasma levels altered in preeclampsia?	168
5 CONCLUSÃO.....	172
REFERÊNCIAS	173
APÊNDICES.....	208

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação específica da gravidez que afeta de 2 a 5% das gestações em todo o mundo e é caracterizada por hipertensão com ou sem proteinúria, que se desenvolve após 20 semanas de gestação (ACOG, 2020). A PE resulta de placentação anormal, causando insuficiente perfusão sanguínea uteroplacentária e isquemia (JAIRAJPURI *et al.*, 2017). Pode resultar em morbidade materna e perinatal grave, incluindo restrição do crescimento intrauterino (CIUR), prematuridade e casos de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional (RNPIG) (MUNAUT *et al.*, 2016).

Embora seja considerada primariamente como uma condição hipertensiva, os perigos da PE vão além, incluindo vários efeitos sistêmicos, como insuficiência renal, pancreatite e anemia hemolítica. Os sintomas geralmente aparecem em mulheres normotensas, sem proteinúria, e surgem em graus de gravidade que podem progredir para convulsões na eclâmpsia, lesão de órgãos maternos e evolução para o óbito (SHEIKH *et al.*, 2016). A PE também pode estar associada à trombocitopenia, insuficiência renal, insuficiência hepática, edema pulmonar, sintomas cerebrais e sintomas visuais (MUNAUT *et al.*, 2016). Seus sintomas podem se assemelhar ou sobrepor aos de outras condições, como a síndrome HELLP (*hemolysis low platelet thrombocytopenia*) – o que pode dificultar um diagnóstico preciso (SHEIKH *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que a PE constitui a principal causa da morbi/mortalidade materna e perinatal em todo o mundo, sendo responsável por 10-15% das mortes maternas (MUNAUT *et al.*, 2016). Estima-se que essa doença seja responsável anualmente por mais de 60.000 mortes em todo o mundo (WINGER *et al.*, 2018). Na maioria dos casos, a intervenção terapêutica inclui o parto prematuro e a completa remoção da placenta. Embora essa intervenção proteja a mãe, resulta em morbidade e mortalidade significativas para o neonato. Dessa forma, a definição de um método de predição precoce tem sido o alvo da comunidade científica, visando uma intervenção terapêutica seja implementada antes mesmo do estabelecimento dos sintomas da doença (WINGER *et al.*, 2018).

Embora os mecanismos etiopatogênicos da PE não estejam totalmente elucidados, admite-se que envolva uma combinação de aspectos genéticos,

imunológicos e angiogênicos. Nesse contexto, a placenta desempenha um papel fundamental no início e progressão dos distúrbios causados pela PE (MUNAUT *et al.*, 2016). A PE se desenvolve em dois estágios distintos. No início da gestação ocorre a placentação anormal, com invasão inadequada do trofoblasto e consequente hipóxia placentária. No segundo estágio, há uma resposta inflamatória sistêmica causada pela liberação de substâncias como a interleucina (IL) -8, IL-6 e IL-1 β na circulação pela placenta submetida a estresse oxidativo, desencadeando os sinais e sintomas da doença (CHEN *et al.*, 2012). Na PE, acredita-se que o remodelamento inadequado das artérias espiraladas por estes trofoblastos invasivos resulte em perfusão inadequada da placenta (SHEIKH *et al.*, 2016). Mediadores pró-inflamatórios e anti-angiogênicos placentários e corpos apoptóticos, liberados na circulação materna, causam disfunção das células endoteliais sistêmicas maternas e inflamação sistêmica (MUNAUT *et al.*, 2016).

Apesar dos extensos esforços de pesquisadores de todo o mundo, ainda há muitas lacunas no entendimento da etiopatogênese da PE. Admite-se que fatores imunológicos, inflamatórios, genéticos e a isquemia placentária estão implicados na sua patogenia, mas o mecanismo exato subjacente à PE permanece obscuro. O parto prematuro induzido, com remoção completa da placenta, continua a ser uma conduta comum no manejo dos sintomas da PE. No entanto, isso não previne o surgimento de complicações tardias, e tanto as mulheres que tiveram PE quanto seus neonatos têm risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas (como diabetes tipo II) ao longo da vida (JAIRAJPURI *et al.*, 2017; LYKOU DI *et al.*, 2018).

Os microRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs não-codificantes (19–25 nucleotídeos) que são evolutivamente conservados e funcionam na regulação pós-transcricional da expressão gênica, por meio da inibição translacional ou degradação do RNA mensageiro. Usando diferentes abordagens metodológicas, vários estudos confirmaram a expressão diferencial de miRNAs em tecidos placentários e fluidos circulantes de mulheres com PE em comparação com gestantes normotensas (JAIRAJPURI *et al.*, 2017; MUNAUT *et al.*, 2016), o que sugere um papel fundamental desse mecanismo epigenético no desenvolvimento alterado da estrutura vascular placentária e subsequente cascata de eventos.

Os miRNAs circulantes têm ganhado muita atenção por partes das pesquisas, pois eles funcionam como uma forma de sinalização clássica, feita pelos hormônios, citocinas e fatores de crescimento. Eles são muito estáveis e capazes de suprimir contra um alvo do mRNA nas células receptoras (GIANNUBILO *et al.*, 2024). Os microRNAs têm papéis fundamentais na regulação de diversos processos biológicos, incluindo diferenciação celular, apoptose e desenvolvimento (SHEIKH *et al.*, 2016) e têm despertado grande interesse no diagnóstico e monitoramento de várias condições, incluindo câncer, doenças autoimunes, inflamatórias e neurológicas (WINGER *et al.*, 2018).

Dado o papel central da placenta no desenvolvimento da PE, evidências sugerem que os miRNAs podem estar implicados na patogênese da doença, regulando vias comuns, tais como angiogênese, hipóxia, isquemia e metabolismo (LYKOUDI *et al.*, 2018). Devido à sua estabilidade no plasma, a avaliação de miRNAs pode encontrar aplicação na detecção precoce de PE (JAIRAJPURI *et al.*, 2017).

Sabe-se que as etiologias propostas para a PE abrangem os campos da genética, imunologia e endocrinologia, dentre outras áreas. No entanto, os mecanismos etiológicos exatos que envolvem a doença não foram completamente elucidados (SHEIKH *et al.*, 2016). Os riscos associados à PE justificam os esforços na busca de um método de predição precoce, considerando a dificuldade de implementação de marcadores capazes prever o desenvolvimento da PE durante o primeiro trimestre, quando se inicia o processo de placentação inadequado (WINGER *et al.*, 2018).

Nesse contexto, os miRNAs associados à PE têm o potencial de servir como biomarcadores viáveis dessa patologia. Foi reportado que os miRNAs podem regular algumas das principais vias propostas para explicar a etiologia da PE, como a isquemia/hipóxia, imunidade e angiogênese/vasculogênese (SHEIKH *et al.*, 2016). Diversos estudos demonstraram a desregulação de miRNAs placentários e circulantes na PE, sugerindo seu envolvimento na patogênese da doença. No entanto, resultados conflitantes relativos ao papel dos microRNAs na PE têm sido encontrados na literatura e podem ser atribuídos a variações metodológicas utilizadas nos diversos estudos (LYKOUDI *et al.*, 2018).

É importante enfatizar que as revisões sistemáticas anteriores foram realizadas dentro do mesmo tópico (CIRKOVIC *et al.*, 2021; SHEIKH *et al.*, 2016). No entanto, é necessário que seja realizada uma atualização dos dados e reavaliação da interpretação desses. Ressalta-se, ainda, que nenhuma revisão sistemática foi conduzida até o presente momento objetivando avaliar padrões de expressão de microRNAs nas diferentes classificações da PE (PE de início precoce [EOPE] e PE de início tardio [LOPE]) ou em diferentes trimestres gestacionais.

Considerando a ausência de biomarcadores de predição da PE durante o primeiro trimestre da gestação e o potencial dos miRNAs para predizer a doença, o conhecimento dos perfis de expressão desses miRNAs associados à PE assume grande importância. O avanço no conhecimento dos miRNAs, expressos no plasma ou na placenta, poderá constituir uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos protocolos para predição precoce da doença. Cumpre, ainda, ressaltar que este estudo servirá como referência para orientar futuras pesquisas experimentais e irá contribuir para ampliar o conhecimento acerca da PE, que constitui a linha de pesquisa das professoras Luci Maria Dusse e Patrícia Nessler Alpoim.

Além dos microRNAs, vários outros marcadores genéticos e bioquímicos também têm sido extensivamente investigados nos estudos voltados para a predição precoce da PE. Nesse contexto, elementos relacionados à disfunção endotelial (como o endocan, o óxido nítrico e a dimetilarginina assimétrica – ADMA), à regulação da pressão arterial (como os estrogênios e a enzima conversora de angiotensina – ECA), entre outros, também representam bons candidatos na busca por biomarcadores da PE.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar marcadores genéticos e/ou bioquímicos na pré-eclâmpsia.

Objetivos específicos:

- Reportar, através de uma revisão sistemática, os microRNAs diferencialmente expressos – no plasma ou na placenta – que podem estar associados à ocorrência da PE;
- Identificar se diferentes perfis de expressão de microRNA podem estar associados a diferentes classificações de PE, bem como às diferentes fases da gestação;
- Examinar se os polimorfismos do promotor *DDAH2* -1415G/A (rs2272592), -1151A/C (rs805304) e -449G/C (rs805305), e seus haplótipos, estão associados à PE em comparação com mulheres grávidas normotensas, e se eles afetam os níveis de ADMA nesses grupos;
- Avaliar a frequência de polimorfismos nos genes *ECA* (ins/del no íntron 16) e *ESR1* (rs2234693 e rs9340799) em mulheres com pré-eclâmpsia e gestantes normotensas de Minas Gerais;
- Investigar os níveis de endocan em gestantes com PE e normotensas de Minas Gerais, buscando determinar se os níveis plasmáticos de endocan poderiam ser úteis para determinar a predisposição e/ou desenvolvimento de PE.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PRÉ-ECLÂMPسيا

A pré-eclâmpسيا (PE) é um distúrbio hipertensivo multissistêmico específico da gravidez (AMARAL *et al.*, 2017) que contribui de forma importante para a morbi/mortalidade materna, fetal e neonatal, sendo responsável por 2-8% das complicações gestacionais (KHODZHAEVA *et al.*, 2016). A PE é responsável por cerca de 50.000-60.000 mortes relacionadas com a gravidez por ano em todo o mundo, especialmente em países de baixa e média renda (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2013).

Os critérios diagnósticos para PE foram definidos pela Sociedade Internacional para o Estudo da Hipertensão na Gravidez (do inglês *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* - ISSHP) em 2014 (TRANQUILLI *et al.*, 2014) e pela ACOG (do inglês *American College of Obstetricians and Gynecologists*) em 2020 (ACOG, 2020). A pré-eclâmpسيا é definida como hipertensão *de novo*, presente após 20 semanas de gestação, combinada com proteinúria (> 300 mg/dia) ou outras disfunções de órgãos maternos, como insuficiência renal, envolvimento hepático, complicações neurológicas ou hematológicas, disfunção uteroplacentária ou restrição de crescimento fetal. MOL *et al.*, em 2016, propuseram que a proteinúria não é mais necessária na nova definição da doença e a PE com e sem proteinúria passaram a ser duas categorias distintas (MOL *et al.*, 2016).

Complicações como eclâmpسيا, síndrome HELLP (hemólise com elevação das enzimas hepáticas e plaquetas baixas), acidente vascular cerebral hemorrágico, insuficiência renal e edema pulmonar constituem os desfechos catastróficos da PE (AMARAL *et al.*, 2017). Outra complicação inclui o risco aumentado de desenvolvimento de complicações cardiovasculares e diabetes mellitus mais tarde na vida, tanto da mãe, quanto do filho (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

A placenta constitui o principal substrato anatômico etiopatogênico para a PE, inclusive em ambiente extrauterino ou na ausência de embrião (ALPOIM; PINHEIRO; *et al.*, 2013). Apesar do grande volume de estudos científicos desenvolvidos nas últimas décadas acerca da PE, sua etiologia, patogênese e fisiopatologia ainda são

pouco compreendidas (GATHIRAM; MOODLEY, 2016). Porém, já é amplamente reconhecido o envolvimento de respostas imunológicas e inflamatórias anormais (LI, CUI; LIU; DUAN, 2024).

Para compreender a fisiopatologia da PE, primeiramente é essencial compreender as características do desenvolvimento placentário em gestações normais. Esse processo envolve as seguintes etapas:

2.1.1 Placentação e resposta inflamatória sistêmica em gestações normais

A placentação e invasão trofoblástica do tecido materno envolvem dois processos, em primeiro lugar a vascularização para estabelecer uma rede vascular feto-placentária e, em segundo lugar, a invasão das artérias espiraladas maternas pelos citotrofoblastos ou trofoblastos endovasculares (TEVs). No momento da implantação, as células trofoblásticas se diferenciam em citotrofoblastos e sincitiotrofoblastos. Os citotrofoblastos formam os trofoblastos extravilosos (TEV), que invadem os segmentos miométricos deciduais e da zona juncional, o terço interno do miométrio e as artérias espiraladas. Os TEVs induzem a remodelação dessas artérias, talvez causando perda da lâmina elástica, a maioria das células musculares lisas e substituindo temporariamente as células endoteliais, transformando assim um sistema vascular de alta resistência e baixo fluxo em um sistema de baixa resistência e alto fluxo, essencial para o crescimento fetal normal (SHARMA *et al.*, 2024; ZHOU, YAN *et al.*, 2002).

Dessa forma, os citotrofoblastos, de natureza epitelial, substituem as células endoteliais e, no processo, os receptores semelhantes ao epitélio são substituídos por moléculas de adesão maternas, como a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) caderina endotelial vascular, molécula endotelial plaquetária-1 e integrina $\alpha V\beta 3$ (ZHOU, YAN *et al.*, 2002). Admite-se que esse processo tenha um papel na prevenção da rejeição fetal pelo organismo materno. Os trofoblastos, portanto, assumem o fenótipo das células endoteliais e ficam em contato direto com o sangue materno, mas os sangues materno e fetal não se misturam (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

Os sinciciotrofbastos são multinucleados, revestem as vilosidades coriônicas e atuam como uma interface entre o sangue materno e o fetal. Segundo Brosens *et al.* (2011), a invasão trofoblástica das artérias espiraladas é precedida por edema da parede do vaso, desintegração das fibras elásticas e alterações na camada muscular lisa, levando à perda de miofibrilas. Dessa forma, não é unanimemente aceito que as próprias células trofoblásticas causem a desintegração das fibras elásticas e perda de miofibrilas (BROSENS, IVO *et al.*, 2011).

A migração dos trofbastos para as artérias espiraladas é influenciada por vários fatores, como citocinas, fatores de crescimento, tensão de oxigênio e o ambiente celular local como, por exemplo, células imunes, como macrófagos e células *natural killer* decíduais / uterinas (dNK) (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

O trofbasto fetal é considerado um alo-antígeno e a mãe reage a isso e monta uma resposta inflamatória sistêmica estéril e de baixo grau. Acredita-se que as micropartículas de sinciciotrofbastos (MPSTBs) detectadas na circulação materna possam ser a causa dessa resposta inflamatória. No entanto, sabe-se que a perfusão útero-fetal só começa no final do primeiro trimestre, enquanto os níveis aumentados de MPSTB na circulação materna são detectados durante o segundo e terceiro trimestres. Tem sido sugerido que a resposta inflamatória inicial durante o primeiro trimestre pode ser devida à interação entre as células imunes decíduais e as células trofoblásticas, e uma resposta inflamatória secundária, durante o segundo e terceiro trimestres, pode ser devida às MPSTBs liberadas no sistema vascular da mãe (GERMAIN *et al.*, 2007).

2.1.2 Etiopatogenia

Está bem estabelecido que a remoção completa da placenta leva à resolução de sintomas clínicos agudos de PE. Na gravidez normal, a placenta sofre vascularização intensa para permitir a circulação entre o feto e a mãe. A vascularização placentária envolve vasculogênese, angiogênese e remodelamento da artéria espiralada materna. Esses processos exigem um equilíbrio delicado de fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos. Acredita-se que o desequilíbrio de fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos na PE desencadeie a vascularização placentária anormal e o início da doença. Sabe-se que várias condições predispõem

à PE, como história pregressa e história familiar de PE, primiparidade, gestação gemelar e também está associada à obesidade, diabetes e hipertensão essencial (JENA *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2024). Todos esses fatores serão abordados mais adiante com maiores detalhes.

2.1.3 Apresentação clínica da pré-eclâmpsia: sinais e sintomas

A apresentação clínica da PE é variada. As mulheres são, em sua maioria, assintomáticas e a doença é frequentemente diagnosticada durante o atendimento pré-natal de rotina. Os desfechos adversos maternos são registrados em 10% das gestantes com PE, enquanto este risco aumenta para 15% naquelas com doença de início precoce (VON DADELSZEN *et al.*, 2011).

A apresentação clínica e os achados podem ser indicativos da morbidade multissistêmica subjacente. As gestantes com PE grave frequentemente apresentam sintomas como dor de cabeça, distúrbios visuais (incluindo cegueira), dor epigástrica ou náuseas e vômitos. Outras complicações incluem o acidente vascular cerebral ou déficit neurológico isquêmico reversível, cegueira cortical, descolamento de retina, encefalopatia posterior reversível, isquemia ou infarto miocárdico e edema pulmonar e aquelas relacionadas à placenta, tais como descolamento prematuro (MOL *et al.*, 2016).

A PE pode evoluir com complicações neurológicas que incluem convulsões, que caracteriza a eclâmpsia. Outros desfechos graves incluem a coagulação intravascular disseminada e a síndrome HELLP. A síndrome HELLP (do inglês *hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count*), caracteriza-se por anemia hemolítica microangiopática, disfunção hepática e trombocitopenia, com ou sem proteinúria, ou hipertensão grave. O envolvimento hepático manifesta-se por disfunção hepática, hematoma ou ruptura, e o envolvimento renal inclui insuficiência renal aguda que requer diálise. Geralmente tem um início agudo, com rápida deterioração da condição materna, e um terço dos casos se apresenta antes das 28 semanas de gestação. Estima-se que cerca de 10% a 20% das gestantes com PE grave desenvolvem HELLP (JENA *et al.*, 2016).

As complicações fetais na PE grave incluem restrição de crescimento, morte fetal ou neonatal e complicações associadas à prematuridade (HABLI *et al.*, 2009).

2.1.4 Classificações da pré-eclâmpsia

2.1.4.1 Pré-eclâmpsia leve e grave

De acordo com o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG), a PE é categorizada em leve e grave. A PE leve é definida pelo aumento da pressão arterial sistólica (PAS) materna superior a 140mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) superior a 90mm Hg em duas ocasiões separadas por 6 h, com ou sem proteinúria significativa (≥ 300 mg de proteína em uma amostra de urina de 24 h ou ≥ 1 + pelo método semi-quantitativo de fita) após 20 semanas de gestação. A PE grave é caracterizada pelo aumento na PAS superior a 160 mmHg e/ou PAD superior a 110mmHg, em pelo menos duas ocasiões separadas por 6 horas, com ou sem evidência de proteinúria (JAIRAJPURI *et al.*, 2017). Além da hipertensão arterial, algumas características estão associadas à forma grave da PE, tais como: trombocitopenia; disfunção hepática; insuficiência renal progressiva; edema pulmonar e distúrbios cerebrais ou visuais de início recente (ACOG, 2020; AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2013).

Jena e colaboradores (2016) ressaltam que é importante distinguir a PE leve e grave, considerando que as estratégias de manejo diferem (JENA *et al.*, 2016). Contudo, a classificação da PE quanto a sua gravidade tem cada vez mais caído em desuso, uma vez que uma gestante diagnosticada com PE leve também pode evoluir para desfechos desfavoráveis.

2.1.4.3 Pré-eclâmpsia precoce e tardia

Nas últimas décadas, as pesquisas têm fornecido evidências que suportam a hipótese de que há dois fenótipos de PE, dependendo do início da doença: precoce (*early-onset* PE [EOPE], com surgimento dos sintomas antes de 34 semanas) e tardio (*late-onset* PE [LOPE], durante ou após 34 semanas). Alguns grupos de

pesquisadoras consideram a PE precoce e tardia como duas entidades distintas, e até mesmo levantam a possibilidade dessa desordem multissistêmica ser independente do processo gestacional (KHODZHAEVA *et al.*, 2016).

Achados da literatura sugerem que os processos de PE precoce e tardia se desenvolvam sob diferentes mecanismos patogênicos. A PE precoce é a variante clínica mais grave do curso da doença; ocorre em 5-20% de todos os casos de PE e está associada à restrição do crescimento intrauterino (RCIU), circulação sanguínea fetal e uterina prejudicada (detectável por dados de ultrassonografia Doppler), tamanho pequeno da placenta no momento do parto, maior incidência de parto prematuro induzido, morbidade e mortalidade neonatal, impossibilidade de manutenção prolongada da gravidez e, na maioria das vezes, ocorre em primigestas jovens (VALENSISE *et al.*, 2008). A principal característica patológica da PE de precoce é a transformação incompleta das artérias espiraladas, resultando em hipoperfusão da placenta e redução da oferta de nutrientes ao feto. Isso resulta em sinais de restrição do crescimento fetal (RCF) (GATHIRAM; MOODLEY, 2016). O desenvolvimento de PE precoce está associado a um prejuízo na invasão do trofoblasto, à placentação anormal e transformação incompleta das artérias espiraladas uterinas, hipóxia tecidual na placenta e no feto, ausência de mecanismos compensatórios, má-adaptação imunológica e ao aumento do nível de marcadores de disfunção endotelial (KHODZHAEVA *et al.*, 2016).

Por outro lado, a PE tardia tem uma etiologia materna e está associada em grande parte à história somática. Quando não associada à RCIU, tem um prognóstico mais favorável e a possibilidade de uma extensão da gravidez mais prolongada, com suporte da terapia anti-hipertensiva (KHODZHAEVA *et al.*, 2016). A PE tardia é responsável por 75-80% de todos os casos de PE; está associada à morbidade materna (síndrome metabólica, intolerância à glicose, obesidade, dislipidemia, hipertensão crônica), recém-nascidos de peso normal e volume placentário normal (VALENSISE *et al.*, 2008). Na PE tardia, as artérias espiraladas estão levemente alteradas em diâmetro (ou não há nenhuma alteração) e não há sinais de RCF. Isso ocorre porque a PE precoce está relacionada à hipoperfusão placentária, enquanto na PE tardia não há alteração, ou há uma modificação superficial das artérias espiraladas, levando, em alguns casos, à hiperperfusão da placenta (SOHLBERG *et al.*, 2014).

Portanto, pode-se afirmar que a PE precoce e tardia apresentam diferentes vias fisiopatológicas e etiológicas (GATHIRAM; MOODLEY, 2016). Dados clínicos, história médica, levantamentos histológicos e de imuno-histoquímica comprovam a necessidade de distinguir entre as formas precoce e tardia da PE, justificada em termos de mecanismos patogênicos diferentes para a formação e desfechos da gravidez. Conseqüentemente, as possíveis intervenções terapêuticas, prolongando o tempo de gravidez, predizendo e explorando marcadores precoces desta doença e abordagens são personalizadas. Assim sendo, a abordagem geral das investigações acerca de PE, sem distingui-la nas formas precoce e tardia, complicaria os estudos sobre a fisiopatologia dessa doença e, assim, impediria a obtenção de resultados clinicamente significativos (KHODZHAEVA *et al.*, 2016).

2.1.5 Fatores de risco

Embora a predição precisa do risco de desenvolver PE ainda não seja uma realidade, é possível realizar uma distinção entre mulheres de baixo risco e alto risco. São considerados como fatores de risco fortes: histórico de PE prévia ou hipertensão na gravidez, doença renal crônica, hipertensão, diabetes (tipo 1 ou tipo 2) e distúrbios autoimunes, incluindo lúpus eritematoso sistêmico ou síndrome antifosfolípide. Fatores de risco moderados são primeira gravidez, idade de 40 anos ou mais, intervalo gestacional maior que 10 anos, índice de massa corporal de 35 kg/m² ou mais, síndrome do ovário policístico, história familiar de PE e gravidez múltipla (NICE – NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE, 2011; SHARMA *et al.*, 2024). Entretanto, na prática clínica, esses fatores predizem apenas 30% das mulheres que desenvolvem PE (MOL *et al.*, 2016).

Fatores adicionais clínicos e de estilo de vida que predizem PE no início da gravidez incluem pressão arterial média na 15^a semana de gestação, peso materno ao nascer, história familiar de doença coronariana ou PE e sangramento vaginal por mais de 5 dias na gravidez atual. Um aborto espontâneo anterior com o mesmo parceiro, tempo até a concepção de pelo menos 12 meses e alto consumo de frutas foram associados a um risco reduzido de PE, mas a combinação desses fatores resultou em apenas uma modesta previsão de risco (NORTH *et al.*, 2011).

Jena e colaboradores (2016) citam os seguintes fatores de risco para o desenvolvimento da PE: idade <20 ou entre 35 e 40 anos, nuliparidade, história familiar prévia de PE (quatro vezes mais risco de morte materna do que mães que não tiveram pré-eclâmpsia/eclâmpsia) (BILANO *et al.*, 2014), doença cardiovascular anterior, mulher nascida pequena para a idade gestacional e condições médicas, tais como obesidade, hipertensão crônica, doença renal crônica, diabetes mellitus, síndrome do anticorpo antifosfolípide, doenças do tecido conjuntivo, trombofilia. Os autores também citam fatores específicos do estado gestacional, como gestação múltipla, doação de oócitos, novo parceiro, infecção do trato urinário (ITU), mola hidatiforme e hidropsia fetal. Além disso, os autores também afirmam que, como a etiologia da PE não é bem classificada e bem compreendida, a investigação e a identificação dos fatores de risco mais importantes são vitais para a prevenção e o manejo adequado da PE (JENA *et al.*, 2016).

Em um estudo de Bartsch e colaboradores (2016), alguns fatores de risco - síndrome do anticorpo antifosfolípide, hipertensão crônica, PE prévia, diabetes mellitus pré-gestacional, IMC > 30 pré-gestacional e tecnologia de reprodução assistida - foram mais fortemente associados a uma alta taxa de PE, sugerindo que a presença de qualquer um pode ser suficiente para designar uma mulher como “alto risco” (BARTSCH *et al.*, 2016).

Duckitt e Harrington (2005) afirmam que vários fatores que podem ser verificados na primeira consulta pré-natal aumentam o risco de uma mulher desenvolver PE durante a gravidez. Em sua revisão sistemática, os autores concluíram que os fatores de risco mais significativos para o desenvolvimento de PE são histórico de PE e a presença de anticorpos antifosfolípidos. O diabetes pré-existente e um IMC pré-gestacional de ≥ 35 quase quadruplicam o risco; nuliparidade, história familiar de PE e gravidez gemelar quase triplicam o risco; e idade materna ≥ 40 , um IMC na primeira consulta pré-natal ≥ 35 e uma pressão arterial sistólica ≥ 130 na primeira consulta pré-natal representam o dobro do risco. A hipertensão pré-existente, a doença renal, a doença autoimune crônica e intervalo ≥ 10 anos entre gravidezes aumentam o risco, mas não se sabe ao certo o quanto (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

A seguir, serão abordados dados adicionais sobre alguns dos fatores de risco mais citados na literatura.

2.1.5.1 Idade

Mulheres com idade ≥ 40 anos têm aproximadamente o dobro do risco de desenvolver PE, sendo elas primíparas ou múltiparas. Dados nacionais dos EUA sugerem que o risco de PE aumenta em 30% para cada ano adicional após 34 anos (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

2.1.5.2 Nuliparidade

A nuliparidade tem sido sugerida como fator de risco para PE. O risco de PE foi de 26% em pacientes nulíparas *versus* 17% em indivíduos com filhos (GATHIRAM; MOODLEY, 2016). A nuliparidade quase triplica o risco de PE. Mulheres com PE têm duas vezes mais chances de serem nulíparas do que mulheres sem PE (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

O risco de PE também é aumentado com uma história de aborto e mudança de paternidade. Parece haver um componente genético. Mãe e feto contribuem para o risco de PE, a contribuição do feto sendo afetada pelos genes paternos. Uma patologia baseada no sistema imunológico também é proposta, em que a exposição prolongada a antígenos fetais protege contra a PE em uma gravidez subsequente com o mesmo pai (SHAMSI; SALEEM; NISHTER, 2013). Finalmente, uma razão pela qual a PE é mais comum em mulheres nulíparas do que em múltiparas pode ser que, no segundo caso, as artérias uterinas e espiraladas desenvolvam um maior diâmetro, o que é mais fácil para a invasão trofoblástica (ZHOU, YAN *et al.*, 2013).

2.1.5.3 Pré-eclâmpsia em gestação anterior

As mulheres que têm PE na primeira gravidez têm sete vezes o risco de desenvolver PE em uma segunda gravidez. As mulheres com PE na segunda gravidez têm também mais de sete vezes mais probabilidades de ter uma história de

PE na primeira gravidez do que as mulheres na segunda gravidez que não desenvolvem PE (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

2.1.5.4 História familiar de pré-eclâmpsia

Uma história familiar de PE quase triplica o risco de pré-eclâmpsia. Mulheres com PE grave têm maior probabilidade de ter uma mãe ou irmã que tiveram PE (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

2.1.5.5 Gravidez múltipla

Quando uma mulher está grávida de gêmeos, seu risco de desenvolver PE quase triplica. Nem a corionicidade nem a zigosidade das gestações alteram esse risco aumentado. Uma gravidez tripla quase triplica o risco de PE em comparação com uma gravidez gemelar (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

2.1.5.6 Condições médicas pré-existentes

Algumas condições médicas sabidamente aumentam o risco de desenvolver PE, a saber:

- Diabetes dependente de insulina: A probabilidade de PE quase quadruplica se o diabetes estiver presente antes da gravidez (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).
- Hipertensão pré-existente: A prevalência de hipertensão crônica é maior em mulheres que desenvolveram PE do que em mulheres que não desenvolveram (12,1% v 0,3%). Mulheres com PE sobreposta à hipertensão crônica têm taxas significativamente mais altas de morbidade perinatal, crianças pequenas para a idade gestacional e parto antes de 32 semanas. Uma pressão arterial diastólica antes de 20 semanas de ≥ 110 mm Hg ou ≥ 100 mm Hg é mais preditiva do desenvolvimento de PE sobreposta à hipertensão crônica (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

- Doença renal: A prevalência de doença renal é maior em mulheres que desenvolvem PE em comparação com aquelas que não desenvolvem (5,3% *versus* 1,8%) (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).
- Doença autoimune crônica: As mulheres que desenvolvem PE têm maior probabilidade de ter uma doença autoimune (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).
- Síndrome antifosfolípide: A presença de anticorpos antifosfolípidos (anticorpos anticardiolipina, ou anticoagulante lúpico, ou ambos) aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de PE (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

2.1.5.7 Intervalo entre gestações

Em um estudo populacional norueguês, Skjaerven *et al.* (2002) estudaram 551.478 mulheres que tiveram dois ou mais partos únicos e 209.423 mulheres que tiveram três ou mais partos únicos. A associação entre risco de PE e intervalo entre as gestações foi mais significativa do que a associação entre risco de PE e mudança de parceiro. O risco de PE em uma segunda ou terceira gravidez foi diretamente relacionado ao tempo decorrido desde o parto anterior. Quando o intervalo foi de 10 anos ou mais, o risco de PE foi aproximadamente o mesmo que o das mulheres nulíparas (SKJÆRVEN; WILCOX; LIE, 2002).

Um estudo transversal do Uruguai descobriu que as mulheres com um intervalo de mais de 59 meses entre as gestações tinham aumentado significativamente os riscos de PE em comparação com as mulheres com intervalos de 18-23 meses (CONDE-AGUDELO, 2000).

Um estudo de coorte dinamarquês descobriu que um longo intervalo entre gravidezes estava associado a um risco significativamente maior de PE em uma segunda gravidez, quando a PE não estava presente na primeira gravidez e a paternidade não havia mudado (BASSO; CHRISTENSEN; OLSEN, 2001).

2.1.5.8 Índice de massa corporal

Estudos que examinaram o índice de massa corporal (IMC) antes da gravidez sugerem uma duplicação geral do risco de PE com um IMC elevado. Sendo que mulheres com um IMC > 35 antes da gravidez têm mais de quatro vezes o risco de PE em comparação com mulheres com um IMC pré-gestacional de 19-27. Estudos que analisaram a comparação do IMC elevado e normal no momento da primeira consulta pré-natal apontam que o risco de PE é aumentado em 50% naquelas com IMC elevado. Um estudo comparando o IMC baixo e normal no momento da primeira consulta pré-natal descobriu que o risco de PE foi significativamente reduzido com um IMC < 20 (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

2.1.5.9 Pressão arterial na primeira consulta pré-natal

Ambas as pressões arteriais sistólica e diastólica são significativamente maiores no primeiro trimestre para as mulheres que mais tarde desenvolvem PE. Pressões arteriais sistólica e diastólica mais elevadas na primeira consulta estão associadas a um aumento da incidência de PE (3,8% em mulheres com pressão arterial diastólica < 55 mmHg, 7,4% naquelas com pressão arterial diastólica de 70-84 mmHg). Uma pressão arterial sistólica \geq 130 mmHg em comparação com < 110 mmHg na primeira consulta antes de 18 semanas está significativamente associada ao desenvolvimento de PE mais tarde na gestação. Uma pressão arterial média > 90 mmHg na primeira consulta pré-natal está significativamente associada ao desenvolvimento de PE grave (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

2.1.6 Patogênese e Fisiopatologia

Apesar de décadas de pesquisa, a patogênese e a fisiopatologia da PE ainda são pouco ou incompletamente compreendidas. O processo patogênico da PE começa durante o primeiro trimestre, muito antes de os sinais clínicos serem aparentes. Por isso, é difícil identificar biomarcadores precoces. A principal razão para isso é talvez de natureza ética, pois é difícil realizar estudos em gestações precoces, pois estes podem comprometer tanto a mãe quanto a criança, e, além disso, os processos patogênicos podem ser multifatoriais. Em qualquer caso, geralmente

supõe-se que a falta de desenvolvimento placentário adequado é a causa básica da PE de início precoce (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

2.1.6.1 Patogênese da pré-eclâmpsia

A patogênese da PE ainda não está totalmente elucidada, mas muito progresso tem sido feito nas últimas décadas. A placenta sempre foi uma figura central na etiologia da PE, porque a remoção da placenta é necessária para que os sintomas regredam. O exame anatomopatológico de placentas de gestações com PE avançada frequentemente revela numerosos infartos placentários e estreitamento esclerótico de arteríolas (SIRCAR; THADHANI; KARUMANCHI, 2015).

A hipótese de que a invasão trofoblástica defeituosa com hipoperfusão uteroplacentária associada pode levar à PE é apoiada por estudos em animais e humanos. Assim, desenvolveu-se um modelo de dois estágios: remodelamento incompleto da artéria espiralada no útero que contribui para a isquemia placentária (estágio 1) e a liberação de fatores anti-angiogênicos da placenta isquêmica para a circulação materna, que contribui para o dano endotelial (estágio 2) (PHIPPS *et al.*, 2016).

Durante a implantação, os trofoblastos da placenta invadem o útero e induzem as artérias em espiral a remodelar, ao mesmo tempo em que eliminam a camada média das artérias espiraladas miometriais; isso permite que as artérias acomodem o aumento do fluxo sanguíneo independente das alterações vasomotoras maternas para nutrir o feto em desenvolvimento. Parte deste remodelamento requer que os trofoblastos adotem um fenótipo endotelial e suas várias moléculas de adesão. Se esse remodelamento estiver prejudicado, a placenta provavelmente será privada de oxigênio, o que leva a um estado de isquemia relativa e a um aumento no estresse oxidativo durante estados de perfusão intermitente (PHIPPS *et al.*, 2016).

Essa remodelação anormal da artéria espiralada foi vista e descrita há mais de cinco décadas em gestantes hipertensas (BROSENS, I., 1964). Desde então, tem sido demonstrado ser o fator patogênico central em gestações complicadas por restrição de crescimento intrauterino (RCIU), hipertensão gestacional e PE. Uma

limitação dessa teoria, portanto, é que esses achados não são específicos da PE (PHIPPS *et al.*, 2016).

2.1.6.2 Fisiopatologia da pré-eclâmpsia

O remodelamento vascular inadequado e a placenta hipoperfundida, que resultam da migração superficial do citotrofoblasto em direção às arteríolas espiraladas uterinas, têm sido caracterizados como importantes eventos desencadeantes da PE. A placenta torna-se isquêmica, o que leva à liberação de fatores associados à disfunção endotelial vascular materna (ROBERTS, JAMES M.; GAMMILL, 2005). A disfunção endotelial tem sido um fenótipo comum da PE e é caracterizada por vasoconstrição e redução do fluxo sanguíneo para órgãos. Além disso, condições preexistentes, como diabetes e obesidade, contribuem para fatores liberados da placenta isquêmica. Ademais, um aumento nas células imunológicas e nas citocinas inflamatórias está relacionado à disfunção endotelial durante a PE (LAMARCA; CORNELIUS; WALLACE, 2013). É importante ressaltar que características, tais como endotelina-1 (ET-1), fator anti-angiogênico sFlt-1 (tirosina quinase-1 tipo fms solúvel), autoanticorpos agonistas para o receptor tipo I da angiotensina II (AT1-AA) e diminuição do óxido nítrico (NO) têm mostrado importante papel no desenvolvimento da PE (AMARAL *et al.*, 2017). Diversos fatores associados à fisiopatologia da PE serão abordados em detalhes a seguir.

2.1.6.3 Fluxo sanguíneo placentário na pré-eclâmpsia / Isquemia uteroplacentária

O evento inicial na PE inicia-se durante a placentação precoce e parece ser causado pela redução da perfusão uteroplacentária como resultado da invasão anormal dos citotrofoblastos das arteríolas espiraladas. No final do segundo trimestre de gestação normal, as artérias espiraladas uterinas são revestidas exclusivamente por citotrofoblasto e as células endoteliais não estão mais presentes nas regiões endometrial ou superficial do miométrio. Essa remodelação das artérias espiraladas uterinas resulta na formação de um sistema arteriolar de baixa resistência com um aumento dramático no suprimento de sangue para o feto em crescimento (JENA *et al.*, 2016).

Na PE, a invasão das artérias espiraladas uterinas é limitada à decídua proximal, com 30% a 50% das artérias espiraladas do leito da placenta escapando do remodelamento do trofoblasto endovascular. Os segmentos miometriais dessas artérias permanecem anatomicamente intactos, não dilatados e o suprimento de nervo adrenérgico para as artérias espiraladas não é afetado. Essa falha do remodelamento vascular impede uma resposta adequada ao aumento das demandas fetais para o fluxo sanguíneo que ocorrem à medida que a gestação progride. Esse defeito é atribuído à expressão inadequada da integrina pelo citotrofoblasto extraviloso. A invasão trofoblástica prejudicada na PE resulta em uma redução na perfusão uteroplacentária, com a placenta se tornando cada vez mais isquêmica à medida que a gestação progride (JENA *et al.*, 2016).

Técnicas *in vivo* (ressonância magnética e medições Doppler de baixo fluxo) confirmaram que há redução do fluxo sanguíneo para a placenta, devido à remodelação defeituosa da artéria espiralada e à aterosose aguda em PE precoce, mas não na tardia (SOHLBERG *et al.*, 2014).

Acredita-se que a redução do fluxo sanguíneo placentário possa resultar em hipóxia da placenta, que tem sido sugerida como a causa final da PE. Entretanto, nenhuma medida *in vivo* da tensão de oxigênio no espaço interviloso foi feita para afirmar que a hipóxia ocorre. No entanto, acredita-se que a redução do fluxo sanguíneo ou da hipóxia crônica por si só não seja a causa direta das lesões placentárias observadas na PE, mas poderia ser um fator contribuinte. Portanto, foi assumido que as lesões poderiam ser devidas a um tipo de lesão por isquemia-reperfusão ou hipóxia-reoxigenação (HR) causada por radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (EROs) (HUNG; BURTON, 2006).

Além disso, especula-se que ocorra um tipo de fluxo sanguíneo intermitente no espaço interviloso, que poderia ser responsável pelo tipo de lesão HR. No entanto, nenhuma medida foi feita para mostrar que o fluxo sanguíneo para o espaço interviloso é de fato intermitente. Acredita-se que é a natureza pulsátil do fluxo sanguíneo das artérias espiraladas que poderia ser responsável pelo tipo de lesão HR (HUNG; BURTON, 2006).

As artérias espiraladas defeituosas levam a uma deterioração adicional na perfusão placentária, isquemia e agravamento da condição já hipóxica observada em

gravidezes normais. A lesão da HR na placenta, no entanto, resulta em aumento do estresse dos sinciciotrofoblastos, causando necrose, apoptose e liberação de excesso de restos placentários (MPSTBs e vesículas), em comparação com uma gravidez normal, na circulação materna (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

Acredita-se, portanto, que a lesão de isquemia-reperfusão placentária seja fundamental para o desenvolvimento de PE. Além dos MPSTBs, as citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pela disfunção endotelial e pelo aumento das respostas inflamatórias, levam a sinais clínicos de PE, como hipertensão, proteinúria e microangiopatia trombótica, apresentando-se como hemólise, elevação das enzimas hepáticas e baixa contagem de plaquetas (síndrome HELLP), edema pulmonar ou cerebral e convulsões (UZAN *et al.*, 2011). No entanto, não há evidências claras de que isso realmente ocorra e não foi conclusivamente provado que as vesículas de MPSTB e os níveis de micro e nanopartículas estão significativamente aumentados em PE em comparação com gestações normais, e que essas substâncias dão origem ao distúrbio inflamatório observado em PE (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

2.1.6.4 Disfunção endotelial

Durante a PE, os mecanismos responsáveis pela disfunção vascular materna sistêmica ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, fatores anti-angiogênicos, como tirosina quinase-1 tipo fms solúvel (sFlt-1) ou receptor do fator de crescimento endotelial vascular solúvel 1, têm sido associados com diminuição da função renal e hipertensão durante a gravidez (AMARAL *et al.*, 2017).

Os níveis circulantes de sFlt-1 e mRNA do sFlt-1 placentário são mais altos em mulheres que têm PE em comparação com gestantes normais. Além disso, dados de pesquisas com animais demonstraram que o sFlt-1 induz uma síndrome semelhante à PE, que foi associada com o aumento da endotelina-1 (ET-1) e diminuição do óxido nítrico (NO), resultando em disfunção endotelial (MURPHY *et al.*, 2010). Estudos anteriores demonstraram que a ET-1 está aumentada na PE e alguns estudos relatam uma correlação positiva entre a ET-1 e a gravidade dos sintomas. NO é necessário para alterações vasculares durante a gravidez normal para suportar o aumento do volume sanguíneo. Demonstrou-se que a deficiência de NO prejudica o relaxamento vascular em modelos humanos e animais de PE e aumento da biodisponibilidade de

NO poderia contribuir para melhorar os resultados maternos e fetais (AMARAL *et al.*, 2017).

2.1.6.5 Fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos

2.3.6.5.1 Fatores pró-angiogênicos (VEGF, PIGF e TGF- β)

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento placentário (PIGF) desempenham um papel fundamental na angiogênese placentária e acredita-se que sejam secretados pelas células trofoblásticas. O VEGF é considerado essencial para a integridade das células endoteliais maternas. Níveis elevados e reduzidos de VEGF na circulação materna foram relatados em PE (TAL, 2012). Esses resultados conflitantes podem ser devidos às metodologias utilizadas. Níveis elevados poderiam talvez ser devidos ao uso de kits comerciais que medem tanto a forma ligada como a solúvel do VEGF na circulação materna (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

Um estudo longitudinal mostrou que as concentrações séricas de PIGF aumentaram de 15-19 pg/ml durante as semanas gestacionais 21-25, e atingiu um pico em 27-30 semanas em gestações sem complicações, em mulheres com recém-nascidos pequenos para a idade gestacional (RNPIG) e PE sem RNPIGs e, posteriormente, os níveis diminuíram rumo às semanas gestacionais 35-36. No entanto, em PE complicada por RNPIG, o pico ocorreu em 21-25 semanas de gestação, mas em todos os momentos os níveis foram mais baixos do que em mulheres com PE apenas (TAYLOR *et al.*, 2003).

A família do fator de transformação do crescimento- β (TGF- β), especialmente o TGF- β 1 e o TGF- β 3, também foi implicada na PE, mas seu exato mecanismo de ação não é conhecido, exceto que eles são expressos na placenta com PE e reduzem a proliferação, migração e invasão de trofoblastos (FU *et al.*, 2013).

2.3.6.5.2 Fatores anti-angiogênicos (sFlt-1 e sEng)

Os fatores anti-angiogênicos são receptores de VEGF (VEGFR1 e VEGFR2) e Eng. O VEGFR1 é também conhecido como tirosina quinase-1 tipo fms (Flt-1), que é ligado à membrana, enquanto o VEGFR2 é conhecido como receptor de domínio de inserção da quinase (KDR). Sabe-se que a sFlt-1, uma variante de *splice* de Flt-1, é a forma livre (solúvel) encontrada na circulação que não possui o domínio de sinalização transmembrana e intracelular (NEUFELD *et al.*, 1999). Eng solúvel tem efeitos anti-angiogênicos, e como ela tem sítios de ligação para TGF- β 1 e β 3, especula-se que desempenhe um papel na PE (BELL; CONLEY, 2013).

Em 2003, Maynard *et al.* demonstraram a substância sFlt-1 era regulada positivamente na circulação de mulheres com PE. A sFlt-1 é permitida a circular e se ligar ao VEGF e ao PlGF, essencialmente antagonizando sua ligação ao Flt-1 (ou VEGFR1) (MAYNARD *et al.*, 2003). Ambos são estímulos potentes para a expansão vascular essencial ao desenvolvimento da unidade uteroplacentária e atuam através de seus efeitos sobre as células endoteliais (JENA *et al.*, 2016). Quando sFlt-1 foi injetado em ratas usando um adenovírus, elas desenvolveram hipertensão e albuminúria significativas e alterações histológicas consistentes com PE (aumento glomerular, endoteliose e deposição de fibrina nos glomérulos). Assim, sFlt-1 parece ser um mediador chave no desenvolvimento da PE (MAYNARD *et al.*, 2003).

Estudos de Karumanchi *et al.* (2009) destacaram o papel de fatores anti-angiogênicos, como aumento da expressão de sFlt1, juntamente com diminuição de PlGF e sinalização do VEGF (KARUMANCHI; STILLMAN; LINDHEIMER, 2009). Dados clínicos também apoiam a teoria de que tanto os níveis circulantes quanto placentários de sFlt1 são maiores em mulheres com PE do que em mulheres com gravidez não complicada. Níveis circulantes de sFlt1 e PlGF são alterados várias semanas antes do início da doença clínica e estão correlacionados com a gravidade da doença. Os níveis de sFlt1 se normalizam vários dias após o parto, coincidindo com melhora na proteinúria e hipertensão (JENA *et al.*, 2016).

Uma segunda proteína derivada da placenta, endoglina solúvel (sEng), também está supra-regulada na PE, em um padrão semelhante ao sFlt1. sEng, um co-receptor circulante do TGF- β , pode se ligar ao TGF- β no plasma. O TGF- β antagonizante, um fator pró-angiogênico, é análogo ao VEGF antagonista de sFlt-1 (PHIPPS *et al.*, 2016). O mRNA de Eng é regulado positivamente na placenta com

PE e a região extracelular de Eng é clivada proteoliticamente para liberar o excesso de Eng solúvel (sEng) na circulação de pacientes com PE. Este composto não só potencializa as ações anti-angiogênicas da quinase s-Flt-1, como também diminui a produção de óxido nítrico (JENA *et al.*, 2016). De fato, níveis elevados de sEng na circulação mostraram induzir sinais de PE grave em ratas prenhes (PHIPPS *et al.*, 2016).

Venkatesha *et al.* (2006) descobriram que a expressão de RNAm de Eng foi significativamente suprarregulada no tecido placentário (obtido no momento do parto), particularmente nos sinciciotrofoblastos em PE em 25 e 40 semanas de gestação, em comparação com gestações controle pareadas por idade. Esses pesquisadores também descobriram que isso foi acompanhado por um aumento significativo nos níveis séricos (obtidos antes do parto) da sEng em mulheres com PE em comparação com as gestações controle, e concluíram que sEng e sFlt-1 poderiam estar bloqueando as ações do TGF- β 1 e VEGF, respectivamente. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis séricos de TGF- β 1 entre mulheres com gravidez normal e com PE (VENKATESHA *et al.*, 2006).

Venkatesha *et al.* (2006) demonstraram ainda que a administração de sEng a ratas grávidas aumentou significativamente a pressão arterial média aos 17-18 dias de gestação, mas teve efeitos leves a modestos na proteinúria. No entanto, a coadministração de sFlt-1 causou níveis elevados de proteinúria, hipertensão e evidência da síndrome HELLP (VENKATESHA *et al.*, 2006).

2.3.6.5.3 Desequilíbrio no estado pró e anti-angiogênico na pré-eclâmpsia

Há crescentes evidências que sugerem que um desequilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos é responsável pelos efeitos fisiopatológicos observados na PE, e este desequilíbrio surge antes que os sinais clínicos sejam aparentes. No entanto, não se sabe exatamente por que algumas mulheres desenvolvem PE, enquanto outras com características semelhantes, como isquemia placentária e disfunção endotelial, dão à luz apenas a neonatos pequenos para a idade gestacional (PIG), sem manifestar sinais clínicos clássicos da doença (ROMERO *et al.*, 2008).

As amostras de soro obtidas no momento do parto mostraram aumento significativo de sFlt-1 e diminuição das concentrações de VEGF e PlGF na PE, em comparação com controles normotensas. Estudos *in vitro* mostraram que a administração de adenovírus expressando sFlt-1 a ratas prenhes causou hipertensão, albuminúria e endoteliose glomerular, semelhante à observada em PE (MAYNARD *et al.*, 2003).

Um estudo transversal conduzido em mulheres negras africanas a termo antes do parto demonstrou que variações nos níveis plasmáticos de fatores pró-angiogênicos (PlGF e TGF- β) e anti-angiogênicos (sEng e sFlt-1) indicaram uma associação com PE (GOVENDER; NAICKER; MOODLEY, 2013). Em outro estudo semelhante, as concentrações séricas de sFlt-1 foram significativamente aumentadas na PE de início precoce e maiores na PE de início tardio, em comparação com controles normotensos e hipertensos crônicos, enquanto o VEGF não foi detectável em todos os grupos (GOVENDER; NAICKER; MOODLEY, 2013).

Um estudo longitudinal mostrou que pacientes com recém-nascidos PIG tiveram concentrações plasmáticas de sEng significativamente maiores durante a gestação, mas naquelas que desenvolveram PE precoce e tardia, os níveis foram significativamente maiores em 23 e 30 semanas gestacionais, respectivamente, em comparação com gestações normais. No caso dos níveis plasmáticos de sFlt-1, a PE precoce e tardia apresentou níveis mais elevados às 26 e 29 semanas de gestação, respectivamente, em comparação com as gestações normais. No entanto, aquelas com PE precoce e tardia e aquelas com recém-nascidos PIG tinham níveis mais baixos de PlGF ao longo da gravidez, em comparação com controles (ROMERO *et al.*, 2008).

Além disso, foi relatado que os níveis plasmáticos de sFlt-1 estavam elevados em gestantes com PE em comparação com gestações normais em 6-10 semanas, e mais ainda em 2-5 semanas antes do desenvolvimento de um diagnóstico clínico (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2005). Um estudo piloto mostrou que a remoção extracorpórea de 17-34% de sFlt-1 de mulheres com PE entre a idade gestacional de 27 e 31 semanas diminuiu a pressão arterial e reduziu a proteinúria e outras complicações (THADHANI *et al.*, 2011).

O verdadeiro significado desses marcadores angiogênicos pode estar em sua capacidade de prever resultados adversos maternos ou fetais. Rana *et al.* (2013) mostraram que, em um grupo de mulheres com diagnóstico clínico de PE, um nível elevado de relação sFlt-para-PlGF (forma angiogênica) está associado a piores desfechos maternos e fetais em comparação com mulheres com menor razão (forma não angiogênica) (PHIPPS *et al.*, 2016; RANA *et al.*, 2013).

Acredita-se que os níveis desproporcionais de fatores anti-angiogênicos, como sEng e sFlt-1, e fatores pró-angiogênicos, como VEGF, PlGF e TGF β , causem disfunções endoteliais maternas generalizadas, levando à hipertensão, endoteliose renal e coagulação sanguínea (GATHIRAM; MOODLEY, 2016). Assim, a incorporação de marcadores angiogênicos pode ajudar a estratificar o risco de mulheres com alta suspeita de PE. Da mesma forma, os marcadores angiogênicos provaram ser úteis na distinção entre diagnósticos diferenciais, como hipertensão crônica, doença renal crônica (DRC) e nefrite lúpica (PHIPPS *et al.*, 2016).

O PlGF é usado como marcador para remodelação de sincitiotrofoblastos e com isso tem sido usado como biomarcador para a PE. Além disso, com a remodelação inadequada das artérias espiraladas, há hipóxia e com isso aumento do estresse oxidativo placentário. Com a disfunção endotelial placentária, há o aumento do sFlt, sendo também utilizado, portanto, como biomarcador para a PE (FEENSTRA *et al.*, 2023).

2.1.6.6 Fatores imunológicos (inflamação, citocinas e quimiocinas)

Há cada vez mais evidências sugerindo que tanto os processos imunes inatos quanto os adaptativos estão envolvidos na patogênese da PE. O predomínio da imunidade Th1 não está apenas relacionado à má placentação, mas também à resposta inflamatória exagerada e à disfunção endotelial observadas na PE (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

Foi demonstrado que, entre 14 e 18 semanas de gestação, os níveis séricos de fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 10 (IL-10) e interferon- γ (INF- γ) foram significativamente menores em PE do que em gravidez normal (KUMAR *et al.*, 2013). Em outro estudo, foi demonstrado que os níveis séricos de citocinas

circulantes, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, INF- γ , TNF- α e quimiocina proteína induzível pelo interferon- γ (IP-10), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e moléculas de adesão [molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular (VCAM-1)] estavam aumentados em PE em comparação com controles (SZARKA *et al.*, 2010).

Na PE de início precoce, os níveis plasmáticos de TNF- α e seus receptores TNFR1, IL-1 β e IL-12, e a proteína de choque térmico-70 (Hsp-70) foram significativamente maiores do que na PE de início tardio, enquanto as concentrações de IL-10 foram maiores na PE de início tardio do que na PE de início precoce (PERAÇOLI *et al.*, 2013). Achados controversos foram, portanto, relatados nos níveis de algumas das citocinas. As diferenças observadas podem ter sido devidas ao momento da coleta das amostras de sangue (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

No entanto, acredita-se que na PE, em comparação com a gravidez normal, há uma mudança do tipo Th-2 para o tipo Th-1 de imunidade. Sabe-se que o tipo Th-1 produz INF- γ e TNF- α e, portanto, seria de se esperar que as estas citocinas estejam elevadas na circulação (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

Uma meta-análise de artigos publicados sobre concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 na circulação materna mostrou que as concentrações foram significativamente maiores em PE em comparação com controles. Vale ressaltar que, em um estudo no qual foram medidos os níveis de TNF- α , não houve diferença significativa entre pacientes com PE e controles (AJITH, 2016). A partir desses dados, Lau *et al.* (2013) concluíram que, no terceiro trimestre, a PE está associada a níveis mais elevados de TNF- α , IL-6 e IL-10 na circulação materna, em comparação com gestações normais, mas eles encontraram evidências insuficientes para afirmar que isso foi assim no primeiro e segundo trimestres também (LAU *et al.*, 2013).

Um estudo conduzido com uma idade gestacional média de 34 semanas demonstrou que os níveis plasmáticos de IL-6, IL-8 e INF- γ foram significativamente mais elevados em PE em comparação com mulheres grávidas normais e não grávidas, pareadas por idade. O nível de TNF- α não foi significativamente diferente, mas o nível de IL-10 foi significativamente maior em normotensas do que em PE. Além disso, verificou-se que a PE grave estava associada a níveis plasmáticos aumentados de IL-8, IL-6, TNF- α , IL-12 e INF- γ , ligando essas citocinas à resposta

inflamatória exagerada nessa condição (AJITH, 2016). Estudos mostraram que os níveis sanguíneos de citocinas Th-1 (TNF- α , IL-2, IL-12p70), INF- γ , fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e Th-2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) são semelhantes em PE e em mulheres grávidas normotensas (PINHEIRO *et al.*, 2013).

Em estudo recente realizado com mulheres com diagnóstico de PE e gestantes sem intercorrências, foram analisadas algumas moléculas relacionadas ao *checkpoint* imunológico. As moléculas analisadas foram: tirosina imunorreceptora (TIGIT), a CD226 e a CD155. Não foram encontradas anormalidades em suas expressões em mulheres com PE. Essas células estão ligadas a capacidade do sistema imunológico atacar células normais e anormais do corpo, sendo ativadas e desativadas conforme a necessidade (LI, CUI; LIU; DUAN, 2024).

2.3.6.6.1 Inflamação crônica e a patologia da pré-eclâmpsia

Durante uma gravidez normal, há um cuidadoso equilíbrio entre as células imunes TH1 e TH2 e suas respectivas respostas imunes. No entanto, como relatado anteriormente, na PE este equilíbrio é interrompido e há um desvio em direção a uma resposta TH1, levando a um ambiente imunológico crônico semelhante ao experimentado por indivíduos com doenças autoimunes (LAMARCA; CORNELIUS; WALLACE, 2013). O aumento das células imunes e citocinas TH1 aumenta a produção pelas células B de autoanticorpos para o receptor tipo 1 da angiotensina II (Ang II) (AT1-AA), aumenta a expressão de ET-1 e sFlt-1 e aumenta o estresse oxidativo, todos estes fatores contribuem para a fisiopatologia da PE e, finalmente, para o desenvolvimento da hipertensão durante a gravidez (AMARAL *et al.*, 2017).

O que está se tornando mais evidente é que, apesar da etiologia desconhecida da PE, mulheres com obesidade ou com alto índice de massa corporal (IMC:> 30 kg/m²) (SPRADLEY, FRANK; PALEI; GRANGER, 2015; SPRADLEY, FRANK T.; PALEI; GRANGER, 2015), hipertensão crônica, diabetes e lúpus eritematoso sistêmico (LES) anteriores à gravidez são mais suscetíveis ao desenvolvimento de PE (BARTSCH *et al.*, 2016; VILLA *et al.*, 2017). Como a obesidade representa um estado crônico de inflamação de baixo grau, ela é um fator de risco para PE (SPRADLEY, FRANK; PALEI; GRANGER, 2015; SPRADLEY, FRANK T.; PALEI;

GRANGER, 2015). Além da inflamação sistêmica associada à obesidade, um estudo de Aye *et al.* (2014) mostrou que, à medida que o IMC aumenta, também ocorre um aumento da ativação placentária de vias inflamatórias (AYE *et al.*, 2014). Placentas de mulheres obesas também se mostraram lipotóxicas e aumentaram o estresse oxidativo (SABEN *et al.*, 2014).

Mulheres com hipertensão crônica que desenvolvem PE sobreposta à hipertensão crônica têm um perfil imunológico diferente em relação às mulheres com PE apenas. Embora as mulheres com PE sobreposta à hipertensão crônica apresentem evidências de inflamação crônica, a relação de sFlt-1/PIGF não atinge os níveis de gravidade observados nas mulheres com apenas PE. A relação sFlt-1/PIGF no final da gestação não é tão grave quanto aquela experimentada por mulheres com PE, sugerindo que a via inflamatória desencadeada na PE pode ser diferente comparada à da hipertensão isolada, já que um efeito aditivo não foi relatado (COSTA *et al.*, 2016).

Mulheres com diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2) ou diabetes gestacional (DG) apresentam um risco maior de desenvolver PE. Aproximadamente 15-20% das mulheres grávidas com DM1, 10-14% das mulheres grávidas com DM2 irão desenvolver PE (KNIGHT *et al.*, 2012) e mulheres com DG têm uma chance 30% maior de desenvolver PE (WEISSGERBER; MUDD, 2015). Tanto o DM1 quanto o DM2 estão associados à inflamação crônica de baixo grau, o que, juntamente com o fato de que as mulheres com PE tendem a ser resistentes à insulina antes da gravidez, pode ser uma das razões pelas quais as mulheres com diabetes são mais suscetíveis à PE (NUNEMAKER, 2016). As mulheres com DG têm um perfil imunológico semelhante ao das mulheres com PE, pois há evidências de disfunção endotelial, desequilíbrio angiogênico e um aumento no estresse oxidativo. Como a PE está associada à resistência à insulina, assim como à desregulação imunológica, é menos claro se existe uma via etiológica comum entre DG e PE (AMARAL *et al.*, 2017).

O LES é uma doença autoimune que afeta predominantemente as mulheres em idade fértil e está associada à alteração imunológica, especificamente uma redução nas células T regulatórias (TReg). Mais de 20% das mulheres grávidas com LES têm gravidezes complicadas com PE. Para mulheres com nefrite lúpica,

inflamação nos rins devido a LES, que engravidam, a diminuição de TRegs, necessária para uma gravidez bem-sucedida, aumenta o risco de PE. O LES também está associado a anticorpos antifosfolípidos (aFLs) associados à PE, à prematuridade e à restrição do crescimento intrauterino (RCIU). Como todos esses transtornos acima mencionados têm um tema subjacente de inflamação crônica, pode-se sugerir que quando uma disfunção inflamatória patológica é sobreposta ao estado pró-inflamatório da gravidez, podem ocorrer complicações mais graves da gravidez, tais como o desenvolvimento da PE (GLUHOVSCHI *et al.*, 2015).

2.1.6.7 Via da heme oxigenase

Estudos mais recentes focaram nas vias proximais da indução de sFlt-1. Uma dessas vias é promulgada pela heme oxigenase (HO). A enzima HO, que existe em duas formas, Hmox1 e Hmox2, degrada o heme em monóxido de carbono (CO) e outros produtos. A Hmox é suprarregulada em estados de hipóxia e isquemia; seu produto, CO, atua como vasodilatador e demonstrou diminuir a pressão de perfusão na placenta (PHIPPS *et al.*, 2016).

HO é expressa por trofoblastos, e sua inibição tem mostrado resultar em invasão defeituosa de trofoblasto *in vitro* (MCCAIG; LYALL, 2009). Estudos em humanos também mostraram que os níveis de Hmox estão diminuídos em pacientes com PE (ZHAO *et al.*, 2009). Além disso, a adição de soros de pacientes com PE levou à diminuição dos níveis de Hmox *in vitro* (AOKI *et al.*, 2012). Por outro lado, o aumento da expressão gênica de Hmox diminuiu os níveis circulantes de sFlt-1. Curiosamente, os níveis de CO foram encontrados aumentados em fumantes, o que pode explicar o paradoxo do tabagismo, porque o tabagismo parece conferir uma proteção contra a PE (CUDMORE *et al.*, 2007).

2.1.6.8 Deformação proteica

As placentas com PE demonstraram acumular aglomerados de proteínas mal dobradas, o que pode contribuir para a fisiopatologia da doença. Buhimschi *et al.* (2014) propuseram que amostras de urina na PE exibiam congofilia, um marcador bem reconhecido de instabilidade e desdobraimento de proteínas. O material

congofílico da urina inclui proteoformas da ceruloplasmina, cadeias leves livres de Ig, inibidor da serpina peptidase 1, albumina, proteína induzível por IFN 6–16 e β -amilóide de Alzheimer. A presença de agregados β -amilóide em placentas de mulheres com PE e RCF reforça ainda mais a noção de que tais agregados de proteínas podem ser diretamente patogênicos à placenta (BUHIMSCHI *et al.*, 2014).

Constatou-se que a congofilia urinária é significativamente elevada em mulheres de alto risco com PE grave e partos antecipados por indicação médica em comparação com mulheres grávidas saudáveis e hipertensas crônicas ou gestacionais (alto risco foi definido como mulheres com hipertensão crônica, história de PE grave, gestação gemelar, diabetes, nefropatia diabética, nefrolitíase, nefropatia membranosa, doença autoimune ou doença falciforme com histórico de crises). Além disso, em uma parte longitudinal deste estudo, onde 56 mulheres de alto risco foram acompanhadas, 78% das mulheres que desenvolveram PE e necessitaram antecipar o parto apresentaram altos níveis de congofilia (definida por retenção de vermelho do Congo de $\geq 15\%$ após remoção do vermelho Congo não ligado) no início do estudo, que foi > 10 semanas antes da manifestação clínica da doença. No entanto, para mulheres de baixo e alto risco que não desenvolveram PE, não houve diferença significativa em seus níveis de congofilia no início do estudo. Estes achados sugerem que a congofilia desempenha um papel fisiopatológico no início da doença e pode ser usada como um marcador preditivo (BUHIMSCHI *et al.*, 2014).

2.1.6.9 Via do Óxido Nítrico

O sistema de óxido nítrico (NO) / óxido nítrico sintase (NOS) também está alterado na PE. O NO é um vasodilatador potente que age para induzir relaxamento nas células musculares lisas vasculares por meio de uma via de monofosfato de guanossina cíclica (QUILLON; FROMY; DEBRET, 2015). Níveis diminuídos de NO e níveis aumentados de arginase (que degrada uma molécula precursora na via NOS) foram relatados na PE (DAI *et al.*, 2013; SANKARALINGAM; XU; DAVIDGE, 2010). Demonstrou-se que uma deficiência de NO está correlacionada com desarranjos metabólicos vistos na PE, como hipertensão, proteinúria e disfunção plaquetária (DAI *et al.*, 2013). A deficiência de NO induz as alterações uteroplacentárias características da PE em camundongos prenhes, incluindo diminuição do diâmetro da artéria uterina,

comprimento da artéria espiralada e fluxo sanguíneo uteroplacentário (KULANDAVELU *et al.*, 2012). Esses achados sugerem que um sistema NOS intacto é essencial para a remodelação da artéria espiralada normal e gravidez (PHIPPS *et al.*, 2016)

2.1.6.10 Estresse oxidativo

Desde o início da gestação, a placenta assume um estado de estresse oxidativo decorrente do aumento da atividade mitocondrial placentária e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente ânion superóxido. Na PE, um nível elevado de estresse oxidativo é encontrado (MYATT; CUI, 2004). A fonte foi atribuída à placenta, onde a síntese de radicais livres ocorre, com os leucócitos maternos e o endotélio materno como prováveis contribuintes. A enzima NADPH oxidase produtora de superóxido, por exemplo, mostrou estar presente no trofoblasto placentário. Mulheres com PE de início precoce apresentaram maior produção de superóxido em comparação com aquelas com doença de início tardio (RAIJMAKERS *et al.*, 2004).

Na PE de início precoce, acredita-se que o estresse oxidativo causado pela baixa tensão de oxigênio ou pelo rompimento do mecanismo de detecção de oxigênio nas placentas cause a superexpressão do fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1 α) no tecido placentário, e também liberação de níveis aumentados na circulação (LARESGOITI-SERVITJE, 2013).

Na gestação normal, a expressão placentária e a formação de HIF-1 α aumentaram em um ambiente hipóxico durante o primeiro trimestre e isso foi paralelo ao TGF- β 3, no qual a diferenciação trofoblástica precoce e a expressão placentária de ambas as moléculas permaneceram altas até cerca de 10^a semana gestacional, quando os níveis de O₂ da placenta começaram a aumentar. Isso foi especulado como responsável pelo crescimento do trofoblasto extraviloso (TEV) e pela invasão das artérias espiraladas. No entanto, notou-se que na PE a expressão e a formação de HIF-1 α e conseqüentemente o TGF- β 3 permaneceram elevados, resultando na invasão superficial do trofoblasto das artérias em espiral (CANIGGIA *et al.*, 2000).

O aumento da expressão do gene heme (Hb) na presença de hipóxia ou estresse oxidativo também foi observado em placentas de PE, e junto com a hemoglobina fetal (HbF), acredita-se estar envolvido na patogênese da PE. Hansson *et al.* (2015) mostrou que a hemoglobina livre, além de causar estresse oxidativo, também causava danos à placenta e ao rim (HANSSON; NÄÄV; ERLANDSSON, 2015).

A hipóxia placentária, e talvez o estresse oxidativo, que ocorre na PE também é conhecida por suprarregular a expressão gênica e a formação de Eng no tecido placentário, talvez via TGF- β 3. A ação de Eng e seu receptor sEng já foram discutidos anteriormente. Talvez, de forma semelhante, haja sobre-expressão de genes responsáveis pela formação de sFlt-1, PlGF e VEGF em placentas com PE. No entanto, por razões éticas, é difícil estudar a expressão gênica em placentas antes do diagnóstico clínico de PE (REDMAN; SARGENT, 2009).

Segundo Feenstra *et al.* (2023), em seu estudo foram analisadas amostras de sangue materno para averiguar as concentrações de tióis livres sistêmicos (FT) que possuem a capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio. Os níveis plasmáticos mais aumentados do FT estão associados a um melhor prognóstico para uma infinidade de doenças inflamatórias e isquêmicas (FEENSTRA *et al.*, 2023).

2.1.6.11 Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e autoanticorpos do receptor tipo 1 da angiotensina (AT1-AA)

Renina, angiotensina II e aldosterona diminuem na PE, ao contrário da gravidez normal. Numerosos estudos relatam a presença de anticorpos agonistas do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1 Ab) encontrados na circulação em mulheres com PE. Esses autoanticorpos podem levar ao aumento de alguns fatores (Flt1, sEng, inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), espécies reativas de oxigênio, fator tissular e NADPH oxidase) que levam à disfunção das células endoteliais e aos danos vasculares (JENA *et al.*, 2016).

A presença de AT1-AA foi descrita pela primeira vez por Wallukat *et al.* (1999) em pacientes com PE. Estes autoanticorpos parecem ser patogênicos em uma variedade de vias propostas (WALLUKAT *et al.*, 1999). Dechend *et al.* (2003)

descobriram que os AT1-AA isolados de soros de mulheres com PE causam sobre-regulação de ROS e dos componentes NADPH oxidase, bem como NK- κ B (DECHEND *et al.*, 2003). O fato de que a transferência de AT1-AA humana purificada de mulheres com PE para camundongos prenhes induziu um fenótipo clínico de PE mostra ainda sua patogenicidade (ZHOU, CISSY C *et al.*, 2008).

Evidência de uma relação entre AT1-AA e fatores angiogênicos também existe. Em camundongos, a presença de AT1-AA parece induzir liberação de sFlt-1 (ZHOU *et al.*, 2007). Além disso, AT1-AA estimula sFlt-1 e sEng induzindo TNF- α e superando seu regulador negativo, HO (ZHOU *et al.*, 2010). Em termos de estudos humanos, Stepan *et al.* (2006) não encontraram correlação entre os níveis de AT1-AA e sFlt-1 (STEPAN *et al.*, 2006), enquanto Siddiqui *et al.* (2010) encontraram (SIDDIQUI *et al.*, 2010). Dados esses resultados mistos em humanos, permanece questionável se os níveis de AT1-AA e sFlt-1 compartilham o mesmo mecanismo fisiopatológico (PHIPPS *et al.*, 2016).

Verdonk *et al.* (2014) apresentaram um relato detalhado do envolvimento de autoanticorpos de SRAA e do receptor AT-1 da Ang II (AT-1AA) na fisiopatologia da PE. Eles afirmaram que em gestações normais, particularmente nos estágios iniciais da gestação, há um aumento no volume sanguíneo materno e uma diminuição na resistência total, e para neutralizar uma queda na pressão sanguínea, o SRAA é ativado, resultando em retenção de sódio e água. No entanto, na PE, em contraste com a gravidez normal, o volume sanguíneo intravascular e o débito cardíaco são reduzidos, enquanto a resistência periférica total é aumentada e a maioria dos componentes do SRAA é regulada negativamente (VERDONK *et al.*, 2014).

Essas descobertas levam à conclusão de que, na PE, a supressão da maioria dos componentes do SRAA poderia levar ao aumento da resposta à Ang II e ao AT-1AA. Eles relataram que o papel exato dos sistemas RAAS e AT-1AA no PE permanece sem resposta, mas afirmam que a sensibilidade dos receptores de Ang II à Ang II está aumentada, e a síntese de angiotensinogênio é estimulada pelos altos níveis de estrogênio circulatório nas primeiras 10 semanas de gravidez (VERDONK *et al.*, 2014).

Descobriu-se que os níveis de angiotensinogênio de alto peso molecular eram cerca de 25% mais altos que os níveis totais de angiotensinogênio na PE, em

comparação com 16% na gravidez normal. No entanto, verificou-se que a atividade da renina plasmática, os níveis de Ang II e aldosterona estavam diminuídos. Atualmente, portanto, faltam evidências do papel exato do SRAA na PE (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

Os autoanticorpos circulantes contra AT-1AA aumentaram após 20 semanas de gestação e o AT-1AA foi mais previsível na PE de início tardio do que na PE de início precoce (HERSE *et al.*, 2009). É possível que a Ang II, ao ativar os receptores AT-1 em trofoblastos humanos, pudesse desempenhar um papel na invasão superficial por trofoblasto das artérias espiraladas através da secreção do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1). Achados semelhantes para AT-1AA foram observados em estudos *in vitro* utilizando células mesangiais humanas, onde causou aumento da secreção de PAI-1 e IL-6, em comparação com IgG de pacientes normotensas. Especulou-se ainda que estas ações do AT-1AA poderiam explicar o dano renal observado em pacientes com PE (BOBST *et al.*, 2005).

Xia e Kellems (2013) estudaram o papel fisiopatológico da AT-1AA. Eles mostraram que esses auto-anticorpos desempenham um papel crítico na PE, e o bloqueio dos receptores AT-1 em modelos animais reverteu os sinais e sintomas da PE, reduzindo os níveis circulatórios de sFlt-1 e IL-6 (XIA; KELLEMS, 2013).

No entanto, ainda não foi demonstrado de forma conclusiva que em pacientes humanos AT-1AA desempenhe um papel importante na fisiopatologia da PE, uma vez que a maioria dos experimentos foram realizados em modelos animais, o que pode não representar o que acontece em PE. Além disso, não foi conclusivamente demonstrado que em todas as mulheres com PE os níveis de AT-1AA são elevados (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

2.1.6.12 Via do Sulfeto de hidrogênio (H₂S)

O sistema de geração de sulfeto de hidrogênio (H₂S) também tem sido implicado na patogênese da PE. O H₂S é uma molécula sinalizadora gasosa em humanos e animais. É produzido em células endoteliais. Tem propriedades vasodilatadoras e está envolvido na contratilidade uterina. O H₂S endogenamente

produzido também possui propriedades angiogênica e anti-inflamatórias. Neste último caso, o H₂S atua na interface endotelial-leucocitária (MOLDENHAUER *et al.*, 2003).

Verificou-se que a administração crônica de H₂S tem efeitos hipotensores num modelo de rato e reduziu o enfarte na lesão de isquemia-reperfusão em ratos experimentais (GATHIRAM; MOODLEY, 2016). Níveis reduzidos de moléculas precursoras de H₂S foram encontrados em pacientes com PE (PHIPPS *et al.*, 2016).

A produção de H₂S requer uma de duas enzimas: cistationina γ -liase (CSE) ou cistationina β -sintase (CBS). Ambas as enzimas estão localizadas nas células endoteliais fetais das vilosidades tronco e coriônica, e as células Hofbauer expressam mRNA de CBS (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

Quando os ratos que foram injetados com adenovírus que sobre-expressam sFlt-1 foram tratados com hidrossulfeto de sódio doador de H₂S, mostraram níveis reduzidos de sFlt-1 e aumento do VEGF no soro. A expressão gênica do VEGF nos rins também foi aumentada, sugerindo que os efeitos pró-angiogênicos do H₂S são mediados pelo VEGF. Clinicamente, os ratos apresentaram diminuição da proteinúria, hipertensão e lesão glomerular (HOLWERDA, KIM M. *et al.*, 2014).

Em PE de início precoce, mas não na tardia, a expressão de mRNA de CBS foi sub-regulada (HOLWERDA, K.M. *et al.*, 2012). Um estudo mostrou que a expressão de mRNA da CSE foi reduzida em tecido placentário com PE e em mulheres com recém-nascidos PIG, em comparação com a gravidez normal. A redução na expressão de CSE foi acompanhada pela redução na concentração de H₂S na circulação materna. Além disso, verificou-se que os trofoblastos e as células mesenquimais no núcleo das vilosidades coriônicas eram os locais de expressão de CSE (WANG, KEQING *et al.*, 2013).

A inibição da CSE pela DL-propargilglicina (PAG) em ratas prenhes resultou em hipertensão e elevação nos níveis de sFlt-1 e sEng na circulação, e também causou anormalidades placentárias, enquanto a administração de GYY4137, que inibe a ação da PAG, reduziu os níveis de sFlt-1 e sEng circulantes e restaurou o crescimento fetal (WANG, KEQING *et al.*, 2013). Isso demonstra que o H₂S é necessário para o desenvolvimento placentário (GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

Além disso, foi também demonstrado em estudos *in vitro* que a desregulação da via CSE/H₂S afetou a remodelação da artéria espiralada e o desenvolvimento placentário. Ademais, verificou-se que a inibição de CSE com PAG em explantes placentários de gravidezes de primeiro trimestre reduziu a produção de PIGF. Wang *et al.* (2013) são da opinião de que seus achados implicam que o H₂S endógeno é necessário para o desenvolvimento placentário e bem-estar fetal e materno. Estes achados talvez mostrem que o H₂S desempenha um papel na patogênese e na fisiopatologia da PE (WANG, KEQING *et al.*, 2013). No entanto, considera-se que os níveis plasmáticos de H₂S foram superestimados em alguns dos estudos acima e podem não refletir os valores reais (WANG, KEQING *et al.*, 2014).

2.1.6.13 Genética da pré-eclâmpsia

A causa da PE não é clara. Algumas mulheres são geneticamente predispostas a desenvolver a doença, que pode ocorrer em famílias (WILLIAMS; BROUGHTON PIPKIN, 2011). Associações robustas foram identificadas entre a PE e variantes genéticas envolvidas na trombofilia, inflamação, estresse oxidativo e o sistema renina angiotensina (JEBBINK *et al.*, 2012; RANA; KARUMANCHI; LINDHEIMER, 2014).

Em uma meta-análise de estudos para identificar variantes gênicas associadas à PE, 22 variantes foram reproduzíveis entre os estudos, com 7 remanescendo significativas após a meta-análise. No entanto, variantes genéticas trombofílicas têm sido consistentemente associadas à doença. Interações entre variantes genéticas maternas e genes que codificam o HLA-C fetal demonstraram predispor gestações à PE em pessoas brancas, africanas subsaarianas e na população Han chinesa, sugerindo um papel de uma tolerância imunológica debilitada na patogênese da PE. Em mulheres com PE, os fatores anti-angiogênicos placentários são regulados positivamente e interferem no endotélio materno, levando a um estado anti-angiogênico que pode resultar em sinais clínicos de PE (MOL *et al.*, 2016).

2.2 REVISÃO SISTEMÁTICA

A pesquisa é essencial para ampliação do conhecimento em todas as áreas. Para o êxito de uma pesquisa é necessário definir com clareza o problema a ser estudado, elencar os objetivos de forma clara, traçar o caminho para alcançá-los, incluindo a coleta de dados e definição das análises e interpretação dos resultados. Para o sucesso desse processo é fundamental conhecer amplamente o assunto, o que é viabilizado pela revisão da literatura. Dessa forma, é possível identificar as lacunas, moldar e orientar o pesquisador sobre os caminhos a seguir em sua pesquisa (OKOLI; DUARTE; MATTAR, 2019).

O termo revisão da literatura compreende todos os estudos que são publicados que permitem um exame minucioso da literatura acerca de um específico assunto. No entanto, é possível encontrar diversas abordagens nos diferentes artigos de revisão da literatura. Dessa forma, já foram identificados 14 diferentes tipos de revisão da literatura (GALVÃO; RICARTE, 2019).

A revisão da literatura é essencial para que se desenvolvam os trabalhos científicos. Realizar todo o processo de revisão permite que sejam observadas, por meio de outros trabalhos, as possíveis falhas, conhecer novos recursos, não repetir, nem duplicar as pesquisas e ainda replicar ou reaproveitá-las em contextos diferentes. Ao reaproveitar e replicar os dados encontrados, é possível desenvolver novas hipóteses, propor novos problemas e desenvolver em outras metodologias (GALVÃO; RICARTE, 2019).

A revisão narrativa tradicional é mais rápida e subjetiva, representando o tema sob a visão dos autores. Portanto, ela é mais propensa a erros e a um maior número de vieses. Esse tipo de revisão costuma ser parcial, apresenta uma temática mais aberta, não exige nenhum protocolo para a sua confecção. A seleção de artigos ocorre de maneira arbitrária. Além disso, a revisão narrativa não descreve a seleção dos artigos, não avalia a qualidade dos estudos e não descreve os processos de pesquisa da literatura (CORDEIRO *et al.*, 2007; DONATO; DONATO, 2019).

A primeira revisão sistemática (RS) em um cenário clínico foi publicada em 1955 pelo *Journal of American Medical Association*. No final da década de 80, por meio da publicação do livro *Effective Care During Pregnancy and Childbirth*, foram consolidadas as revisões sistemáticas realizadas juntamente com meta-análises. Em

1990 foi fundada a *Cochrane Collaboration* que consiste em uma organização internacional que tem por objetivo preparar, manter e disseminar as revisões sistemáticas realizadas na área da saúde. Ainda durante a década de 90, foram publicadas duas teses de revisões sistemáticas com meta-análises, sendo uma delas publicada no Brasil e a outra na Inglaterra (CORDEIRO *et al.*, 2007).

A RS é uma modalidade de pesquisa que tem como objetivo reunir informações, avaliar criticamente e conduzir a uma síntese dos resultados baseados em múltiplos estudos primários (CORDEIRO *et al.*, 2007; GALVÃO; RICARTE, 2019). Ela é fundamentada em uma pesquisa bibliográfica abrangente que avalia criticamente os estudos individuais, sendo reproduzível e imparcial (DONATO; DONATO, 2019).

Essa modalidade busca entender e dar logicidade a questões documentais principalmente realizando a verificação do que funciona ou não em um determinado contexto, para isso ela segue protocolos específicos. Ela apresenta de forma explícita quais as bases de dados utilizadas para consultar os dados bibliográficos, quais foram as estratégias utilizadas para realizar a busca dos artigos em cada uma das bases de dados, todo o processo para a seleção dos artigos, inclusive com os critérios utilizados para inclusão e exclusão e o processo de análise utilizado em cada artigo. Além disso, explicita as limitações presentes em cada artigo, bem como as limitações da revisão. Sendo, de maneira geral, considerada de alto nível de evidência e, inclusive, sendo um documento importante para basear as tomadas de decisões clínicas a nível público e privado (GALVÃO; RICARTE, 2019).

A RS também pode ser conhecida como o termo “síntese da investigação” isso porque ela fornece uma síntese bem abrangente e imparcial de estudos relevantes sobre determinado assunto em um único documento. Ela apresenta muitas características parecidas com a revisão da literatura, porém a revisão sistemática difere na medida em que procura descobrir todas as evidências relevantes que estão relacionadas à pergunta do trabalho, sendo o foco maior nos dados apresentados ao invés dos conceitos ou teoria (AROMATARIS; PEARSON, 2014).

Para que uma RS ocorra, devem estar envolvidas pelo menos duas pessoas, principalmente na etapa de triagem dos artigos e na extração dos dados. A revisão deve ser exaustiva, ou seja, toda a literatura que seja relevante na área pesquisada

deve ser incluída. Uma metodologia rigorosa deve ser seguida e todo o processo deve ser cuidadosamente documentado. Deve-se iniciar com a definição da questão de investigação, seguida da escrita de um protocolo, pesquisa da literatura seguida da triagem e da análise da literatura. Portanto, a estratégia de pesquisa deve ser rigorosamente definida a fim de aumentar a sensibilidade para que artigos relevantes sejam inseridos e considerados (DONATO; DONATO, 2019).

A abordagem qualitativa ou quantitativa na RS depende do objetivo e da pergunta proposta. Geralmente, a abordagem qualitativa está relacionada ao entendimento e à interpretação de questões emocionais, sociais, comportamentais, interações que ocorrem no ambiente de cuidado da saúde e, assim, permite responder sobre possíveis problemas e propor intervenções políticas de saúde. Já a abordagem quantitativa está relacionada à avaliação de intervenções na saúde, como por exemplo sobre prognósticos, profilaxia, eficácia, custo, entre outros (DE-LA-TORRE-UGARTE-GUANILO; TAKAHASHI; BERTOLOZZI, 2011).

A qualidade de uma RS depende dos métodos seguidos a fim de minimizar os riscos de viés e de erros. São múltiplas as etapas em todo o processo da RS realizadas em duplicata por revisores independentes, o que reduz o risco de imprecisões, bem como de interpretações subjetivas e eventuais erros que podem afetar os resultados (AROMATARIS; PEARSON, 2014).

As etapas do processo de RS são basicamente nove, sendo elas: 1) formulação da questão de investigação; 2) produção e registro de um protocolo de investigação; 3) definição dos critérios de inclusão e exclusão; 4) desenvolvimento e realização de uma estratégia de pesquisa; 5) seleção dos artigos e estudos; 6) avaliação da qualidade dos estudos selecionados; 7) extração dos dados necessários nos estudos; 8) síntese e avaliação dos dados, verificando sua qualidade de evidência; 9) publicação dos dados extraídos na pesquisa (DONATO; DONATO, 2019).

2.2.1 Protocolo de pesquisa

A primeira fase da RS consiste na definição do protocolo de pesquisa. Nessa fase, são estabelecidos conjuntos de parâmetros e regras que servem para configurar

a pesquisa, sendo determinadas as características de acordo com a necessidade do trabalho. Essa fase é composta por cinco atividades principais, sendo elas: 1) definição da estratégia de busca; 2) consulta nas bases de dados; 3) organização de um protocolo bibliográfico; 4) padronização para a seleção dos artigos; e 5) composição de um portfólio contendo os artigos e suas descrições (FERENHOF; FERNANDES, 2016).

Antes da realização do estudo, um protocolo deve ser desenvolvido e validado de maneira externa para que possa ser verificada a possibilidade de execução. O protocolo consiste em um plano de descrição detalhada da condução de uma RS da literatura, portanto, todos os revisores envolvidos no estudo devem estar muito bem treinados e preparados com base no protocolo. Ele vai definir se a revisão será mais ampla ou mais estreita, além de definir os locais de busca bibliográfica (OKOLI; DUARTE; MATTAR, 2019).

O protocolo de uma RS deve ter sua identificação, contendo informações como título da revisão, o nome dos autores envolvidos, de acordo com as normas da revista que foi pré-selecionada, para que os resultados sejam divulgados. O título escolhido deve ser objetivo e claro, dando aos leitores as informações necessárias para se saber sobre o tema da pesquisa e a qual tipo de estudo ela pertence (TANIKAWA; FERREIRA; RETONDARIO, 2021).

A construção do protocolo corresponde à parte do planejamento em que as etapas metodológicas serão percorridas a fim de reduzir o risco de viés, promover a transparência relacionada aos métodos e processos, além de permitir que haja uma revisão pelos pares dos métodos previstos (DE-LA-TORRE-UGARTE-GUANILO; TAKAHASHI; BERTOLOZZI, 2011).

O primeiro passo é verificar se a temática escolhida já possui revisões sistemáticas na *Cochrane Library*, *PubMed* ou na biblioteca do *Joanna Briggs Institute (JBI)*. Se as publicações datarem de mais de três anos, é importante observar se os métodos contidos definem critérios específicos de interesse relacionados à temática em estudo e se há lacunas de conhecimento específico para intervenções e em termos de população. Caso seja identificada alguma dessas observações, é justificável a condução de uma nova RS (DE-LA-TORRE-UGARTE-GUANILO; TAKAHASHI; BERTOLOZZI, 2011).

Existem padrões de protocolos que devem responder às exigências internacionais, tanto para as revisões sistemáticas qualitativas quanto quantitativas. Ambos os tipos de RS possuem objetivos, justificativa da RS, estratégia de busca, critérios de inclusão, critérios para avaliação dos estudos, formas de síntese e de extração das evidências científicas, apresentação dos resultados e declaração de conflito de interesse. Após selecionado e escrito todo o protocolo, ele deve ser submetido ao *Cochrane Review Group* ou *Evidence Synthesis Groups* (JBI), ou ainda ao *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO), que farão ou não a aprovação. Quando o protocolo é aceito, ele é publicado em suas respectivas bases de dados. Além disso, a colaboração *Cochrane* desenvolveu um *software* com o objetivo de auxiliar a elaboração do protocolo e o desenvolvimento da RS, dessa forma há aprimoramento dos métodos analíticos e da identificação dos erros, facilitando assim a adequação às normas e diretrizes (DE-LA-TORRE-UGARTE-GUANILO; TAKAHASHI; BERTOLOZZI, 2011).

Para a criação do protocolo, é necessário que todas as informações prévias sejam determinadas, a fim de servir como um guia e passo-a-passo para o estudo. Em um dos critérios que auxiliam na construção e elaboração do protocolo está o acrônimo PICO, criado pela *Cochrane*, em que cada uma das letras tem seu significado derivado do inglês. O “P” significa população (*population*), o “I” é intervenção (*intervention*), “C” é comparação (*comparison*) e “O” é desfecho (*outcome*). Todos esses tópicos, portanto, norteiam tanto a pergunta do trabalho, quanto a elaboração do protocolo (UMAN, 2011).

Idealmente, o protocolo de revisão deve ser desenvolvido e publicado antes de se iniciar a RS. Esse documento deve detalhar os critérios que os estudos precisam ter para serem incluídos na RS, tendo como base os elementos de PICO. Aderir aos critérios de elegibilidade permite que os protocolos de revisão garantam a inclusão de seus estudos tendo como base os elementos PICO” e não apenas as conclusões dos estudos. A estipulação do “desenho de estudo” pode ser incluída no acrônimo passando a ser “PICOS”, onde o “S” está relacionado ao desenho de estudo (AROMATARIS; PEARSON, 2014).

2.2.2 Pesquisa bibliográfica

Elaborar uma estratégia de busca é um dos componentes chave para a revisão. Devem ser definidos os termos para a busca mais apropriados que devem priorizar a sensibilidade em relação à especificidade e assim garantir o resgate de toda evidência potencial disponível. Dessa forma, conhecer os mecanismos de busca das diversas bases de dados é de suma importância, pois eles diferem entre si (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2012).

A delimitação do objetivo e as questões da pesquisa são demandas da RS, assim como as demais pesquisas científicas. A questão da RS deve considerar a especificação da população ou do problema a ser estudado, a intervenção que precisa de análise, se haverá comparações entre as intervenções e qual o desfecho que se tem a pretensão de estudar. Uma das abordagens relacionadas à elaboração da questão é conhecida pela sigla “PICO” em que a letra “p” está relacionada a um problema ou população; a letra “I” está relacionada à intervenção; a letra “C” corresponde à comparação e, por fim, a letra “O” relacionada ao *outcome*/resultado (GALVÃO; RICARTE, 2019).

Uma RS exige uma pesquisa reprodutível, objetiva e minuciosa, que deve identificar o máximo de estudos possíveis. As bases de dados bibliográficos são utilizadas geralmente como primeira opção, pois nelas estão indexadas muitas revistas científicas que podem ser facilmente consultadas. É importante que a pesquisa seja realizada em diversas bases de dados, sendo indicado pela *Cochrane* pelo menos três. Na área da saúde, as bases de dados científicos mais utilizadas são PUBMED/MEDLINE, a *Cochrane Library* e a EMBASE. A literatura cinzenta, que corresponde aos documentos científicos que possuem sua disponibilização por meios incomuns de publicação, acrescenta valor ao trabalho, visto que é habitualmente mais atual (DONATO; DONATO, 2019).

Para a realização da busca na literatura, o pesquisador deve considerar o uso adequado de operadores lógicos (booleanos) e relacionais. Por meio deles, é possível tornar a busca muito mais assertiva. Os principais operadores lógicos utilizados são: “AND”, que significa “E” (seleciona documentos que tenham ambos termos pesquisados); “OR”, que significa “OU” (seleciona documentos que tenham um ou o outro termo pesquisados); “NOT”, que é relacionado a negação (vai selecionar o primeiro termo e excluir o termo que está após o seu uso). Nos campos de busca é

necessário que se utilize os operadores lógicos escritos em letras maiúsculas, pois quando utilizados escritos em minúsculo a quantidade de trabalhos retornados é menor (FERENHOF; FERNANDES, 2016).

Outros recursos podem ser utilizados para deixar a pesquisa ainda mais específica, como, por exemplo, o uso de operadores relacionais. Os principais são: (=) igual; (<>) (!=) diferente; (<) menor; (<=) menor ou igual; (>) maior; (>=) maior ou igual; *BETWEEN* (usado para intervalo de valores); *IN* (usado para verificar se um valor avaliado está dentro da lista; *LIKE* (usado para fazer a comparação de um modelo e especificar termos de um banco de dados. Utilizar like + extensão % serve para buscar todos os resultados que tenham o mesmo início da extensão. As aspas (“) são utilizadas para que o banco de dados trate o termo como um só, tendo resultados diferentes da busca realizada com o “AND”. Quando utilizada a opção de aspas, os termos são pesquisados quando estão juntos, no caso do uso do AND, é realizada a pesquisa em todo texto e os termos podem aparecer separados (FERENHOF; FERNANDES, 2016).

Para uma boa estratégia de uso é interessante que seja englobado vocabulário não controlado, utilizando palavras sinônimas, siglas, termos relacionados, variações na grafia e “palavras-chave”, assim, não se deve restringir apenas aos descritores de assunto. Essa estratégia vai garantir a recuperação de artigos mais antigos e aumentar a sensibilidade da busca (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2012).

2.2.3 Seleção de estudos primários

Após a delimitação da questão a ser tratada no trabalho de RS, é preciso definir quais bases de dados serão consultadas para buscar os artigos e os demais materiais bibliográficos. Anualmente, surgem novas bases de dados, incluindo algumas até mais complexas. Cada base de dados é destinada a um público-alvo e sua cobertura de documentos e temática são variáveis. Portanto, a escolha da base de dados a ser utilizada deve ser compatível com a temática a ser desenvolvida (GALVÃO; RICARTE, 2019).

A pesquisa bibliográfica resultará em um grande número de referências que podem ser potencialmente elegíveis ao trabalho, mas que precisam ser avaliadas usando os critérios pré-definidos para verificar sua possibilidade de inclusão. De todas as referências selecionadas, apenas uma pequena proporção é incluída na RS. Todo o processo de seleção dos trabalhos deve ser explícito e realizado de maneira a minimizar riscos de enviesamentos e de erros (DONATO; DONATO, 2019).

Os estudos a serem incluídos na RS precisam seguir as recomendações preconizadas pela *Cochrane* e pela diretriz JBI. A busca de dados precisa ser realizada por no mínimo dois revisores independentes e os artigos selecionados podem ser transportados e agrupados em *softwares* que fazem o gerenciamento de referências, como por exemplo Mendeley[®], Endnote[®] ou Zotero[®], assim fica mais fácil descartar as duplicatas (TANIKAWA; FERREIRA; RETONDARIO, 2021). Além desses *softwares* para gerenciamento de referências, um outro *software*, o Rayyan[®], auxilia a realizar a primeira seleção dos artigos (OUZZANI *et al.*, 2016).

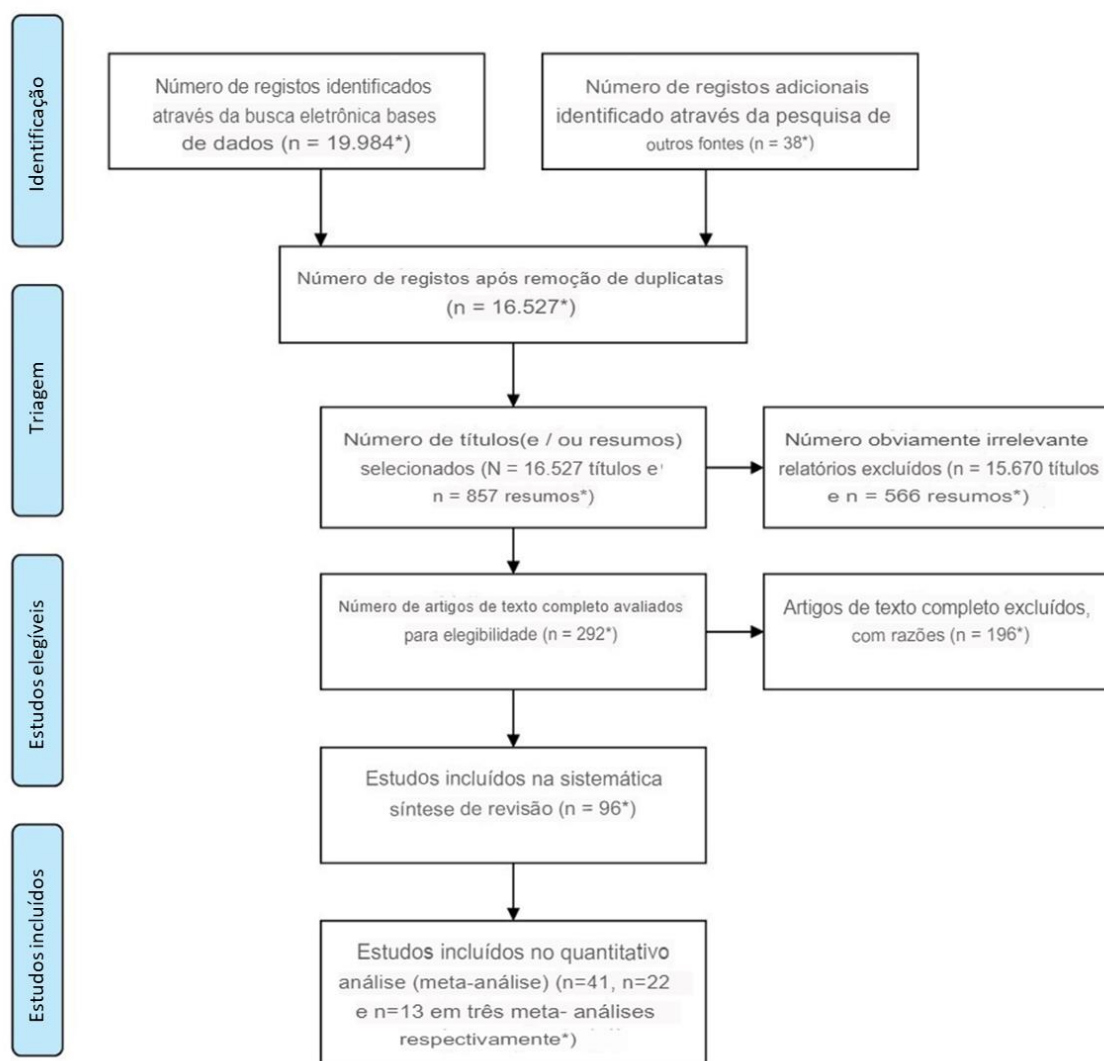
É importante procurar por trabalhos duplicados, pois podem causar resultados enviesados. Contudo, nem sempre é simples a identificação de duplicatas, isso ocorre principalmente com trabalhos múltiplos que podem ser publicados por diversos motivos incluindo: resultados em diferentes períodos, novos desfechos, tradução. Devido à possibilidade de estudos enviesados, a etapa de exclusão de duplicatas se torna essencial (DONATO; DONATO, 2019).

Após a exclusão das duplicatas, começa o processo de seleção dos estudos pelos revisores. Deve-se iniciar com a leitura dos títulos e dos resumos, já realizando uma pré-seleção com base nos critérios de inclusão e exclusão previamente definidos, selecionando assim os artigos potencialmente elegíveis. Essa etapa pode ser realizada nos *softwares* de referências, pelo Rayyan[®], ou ainda fazendo a exportação para *softwares* de edição de texto e/ou planilhas, onde serão importados usando o “*output style Annotated*” em que as informações básicas dos artigos, como ano, título, publicação, resumo e autor são exportadas (TANIKAWA; FERREIRA; RETONDARIO, 2021).

Para que todo esse processo seja bem organizado, visto que dependendo da RS o volume de artigos é muito grande, é recomendado a criação e o uso de um banco de algum programa de edição de planilhas contendo a lista dos artigos com o

registro de toda e qualquer informação pertinente sobre eles. Nessa planilha, deve-se registrar o motivo da exclusão de determinado artigo ou qualquer dúvida quanto a sua inclusão. Após essa pré-seleção, o próximo passo é realizar a leitura da introdução e da conclusão desses artigos a fim de verificar a sua pertinência relacionada ao tema, posteriormente, os artigos selecionados nessa etapa devem passar por uma leitura completa para definir se serão incluídos ou excluídos do banco de dados da RS. Desde o momento inicial até o final desse processo de busca pode-se observar que os artigos passam por uma espécie de funil, ou seja, há uma redução substancial no número dos estudos entre os que foram localizados na busca inicial e os que são elegíveis para a revisão. Quando há alguma divergência entre os artigos selecionados pelos revisores, é necessário que haja uma discussão entre eles para definição da inclusão ou exclusão desses, podendo ou não ter o auxílio de um terceiro revisor. Ao final desse processo de seleção dos artigos, os resultados devem ser representados por meio de um fluxograma (TANIKAWA; FERREIRA; RETONDARIO, 2021).

Figura 1 – Exemplo de fluxograma



Fonte: Adaptada de POLLOCK; BERGE, 2018

2.2.4 Avaliação da qualidade metodológica

Os estudos considerados elegíveis para a revisão passam por um processo denominado análise bibliométrica, que consiste na avaliação crítica da qualidade metodológica. Essa avaliação também é realizada de maneira independente por dois revisores. Quaisquer tipos de divergências que possam surgir são resolvidas mediante um consenso entre eles ou pela avaliação de um terceiro revisor. No caso da avaliação crítica, os dados são relatados por meio de tabelas e em forma narrativa (TANIKAWA; FERREIRA; RETONDARIO, 2021).

A avaliação realizada, visando a qualidade dos estudos a serem incluídos na RS, indicará a confiança para os resultados encontrados. Os resultados podem estar sistematicamente diferentes do que ocorre na realidade a qual o estudo está relacionado, devido às principais fontes responsáveis pelo viés: aferição, seleção e confundimento. Dependendo do delineamento das pesquisas, alguns desses pontos podem apresentar maior ou menor relevância (PEREIRA; GALVÃO, 2014).

2.2.5 Extração de dados

Assim como a fase de seleção dos artigos, a fase de extração dos dados deve ser realizada por, no mínimo, dois revisores de maneira independente. Se ocorrer divergências, elas podem ser resolvidas por um consenso entre a dupla ou pela atuação de um terceiro revisor. Para que os dados sejam padronizados e haja uma extração correta, é necessário que a equipe envolvida para a coleta de dados receba um treinamento prévio (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2012).

Existem vários métodos eficazes para a extração dos dados dos estudos após a aplicação dos critérios de exclusão e a elaboração da lista final dos estudos identificados. Os formulários de extração precisam ser adaptados à pergunta da revisão e os requisitos necessários para a extração dos dados variam de revisão para revisão (DONATO; DONATO, 2019).

Após obter uma lista de artigos selecionados como elegíveis, os revisores devem retirar informações de cada artigo, tais informações servirão para a etapa de síntese. Os dados a serem extraídos vão depender da pergunta de pesquisa que foi estabelecida durante a etapa de protocolo. Um formulário para a extração de dados deve ser utilizado a fim de conter todos os espaços para o armazenamento dos detalhes importantes para a etapa de síntese, além de uma seção para comentários gerais (OKOLI; DUARTE; MATTAR, 2019).

Ao avaliar os desfechos dos trabalhos é importante considerar se a variável é categórica ou contínua e a sua natureza. Em casos de desfechos contínuos, deve-se coletar o número de participantes do estudo, a média e o desvio padrão de cada um dos grupos que participou do estudo. Em casos de desfechos categóricos,

usualmente se coleta o número de pessoas que atingiram o desfecho esperado e o total de pessoas que foram expostas em cada um dos grupos (PEREIRA; GALVÃO, 2014).

Para extrair os dados dos artigos a serem utilizados na RS, é interessante a criação de um formulário ou de uma tabela para melhor organizar os resultados. Podem estar contidos nesse documento dados importantes, como por exemplo: nome dos autores, data de publicação, número de participantes nos grupos inseridos no estudo, faixa etária, resultados, desenho do estudo, critérios de inclusão e exclusão para aqueles casos analisados. A confiabilidade entre os avaliadores da RS ajuda a evitar erros na entrada dos dados (UMAN, 2011).

2.2.6 Síntese de dados

Após a realização da extração dos dados é necessário que se faça um resumo para que se possa retirar conclusões lógicas e válidas. A síntese de dados envolve o ato de recolher, combinar e resumir os resultados dos estudos individuais que foram incluídos na RS. Essa síntese pode ser realizada quantitativamente, com o auxílio de técnicas estatísticas, como por exemplo a meta-análise, ou por uma abordagem narrativa, se o agrupamento dos resultados for inadequado. Para a realização da síntese, tem que ser considerada a força da evidência, explorando se os efeitos apresentados são consistentes, e deve-se fazer uma investigação das razões para a ocorrência dessas inconsistências. Após reunir os estudos adequados, avaliando a sua qualidade, e a realização da estatística, quando possível, devem ser retiradas as conclusões. Os investigadores retomam a questão original e verificam se há evidências suficientes que possam responder de forma conclusiva a pergunta e, se houver, determinam quão forte é a evidência. O próximo passo é, portanto, o da escrita do artigo e a sua submissão para publicação (DONATO; DONATO, 2019).

Para garantir que uma revisão sistemática seja de boa qualidade, os autores devem elaborar um relato transparente, completo e preciso do motivo pelo qual a revisão foi realizada, como ela foi conduzida e quais foram os principais achados. Nesse contexto, a declaração *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), cuja primeira versão foi publicada em 2009, é uma diretriz elaborada para orientar a produção de relatórios adequados de revisões sistemáticas.

A declaração PRISMA 2020 (versão atual) consiste em uma *checklist* de 27 itens, que detalha recomendações de relatórios para cada item, uma *checklist* de resumos e diagramas de fluxo revisados para revisões originais e atualizações (PAGE *et al.*, 2021).

2.3 META-ANÁLISE

Os métodos utilizados nas revisões servem para extrair informações, com ou sem análises estatísticas, de estudos publicados. Quando há a realização de análises estatísticas, os testes utilizados podem não ser adequados devido ao tamanho das amostras e por serem dependentes disso. Por esse motivo, os resultados não significativos acabam não tendo o mesmo peso que os resultados significativos. Nesse contexto, a meta-análise pode mudar a direção, o enfoque e a magnitude dos efeitos nos estudos (LOVATTO *et al.*, 2007).

A meta-análise consiste na utilização de métodos estatísticos para realizar a combinação de resultados de 2 ou mais estudos (DONATO; DONATO, 2019). Ela é uma análise estatística que faz a combinação entre estudos independentes que geram uma única estimativa de efeito. A meta-análise é capaz de estimar com mais precisão o tamanho de um efeito que muitas vezes não é possível ser demonstrado em estudos únicos, seja por metodologia inadequada ou por tamanho insuficiente de amostra (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2012).

Usar da meta-análise consiste em resumir os dados obtidos nos diferentes estudos da maneira mais refinada, pois ela realiza a combinação estatística dos resultados encontrados em cada estudo. Avaliando os estudos selecionados, é interessante verificar somente aqueles que possuem características semelhantes para serem incluídos na meta-análise. Pois, quando há dados encontrados em diferentes medidas, não é recomendada a combinação e/ou comparação desses achados e, portanto, a utilização da meta-análise. A diferença entre os resultados dos estudos e distinção entre eles indicam heterogeneidade estatística e, por isso, não é recomendada a combinação. O método escolhido para calcular a meta-análise vai depender da natureza do dado tratado e as recomendações de cada método são responsáveis por guiar a escolha para o cálculo. Alguns *softwares* estatísticos gerais, como R (gratuito) e STATA (pago), e específicos, como o *Review Manager* (RevMan, gratuito), são utilizados para realização da meta-análise (PEREIRA; GALVÃO, 2014).

No ano de 1952, um pesquisador chamado Hans J. Eysenck afirmou que a psicoterapia não apresentava efeitos benéficos, o que gerou diversos debates entre os profissionais da área. Como forma de comprovar que ele estava errado, em vinte anos de pesquisa avaliando centenas de estudos que não conseguiram resolver

esses problemas, Smith & Glass agregaram resultados estatísticos de aproximadamente 375 pesquisas e concluíram que a psicoterapia tem efeitos. Para esse método estatístico utilizado, usaram o nome de meta-análise (LOVATTO *et al.*, 2007). Em 1976, o termo meta-análise foi utilizado pela primeira vez em um artigo publicado pela revista *Educational Research* (CORDEIRO *et al.*, 2007).

2.3.1 Desenvolvimento da meta-análise

A meta-análise consiste em utilizar metodologias analíticas e estatísticas utilizando um mesmo banco de dados para colocar diferentes estudos juntos, mas que possuem fatores em comuns. Ou seja, se trata de um procedimento metodológico que serve para sintetizar uma quantidade de conclusões em estudos de um campo de pesquisa. Uma de suas vantagens é a de minimizar os possíveis vieses e elevar a objetividade das revisões de literatura (FIGUEIREDO FILHO *et al.*, 2015).

Em uma RS, um passo considerado importante é a consideração cuidadosa sobre a combinação dos resultados numéricos, avaliando se é apropriado considerar todos ou talvez apenas alguns estudos. A meta-análise gera uma estatística global que compreende no resumo da eficácia de uma intervenção do tipo experimental em comparação com uma intervenção comparadora (DEEKS; HIGGINS; ALTMAN, 2019).

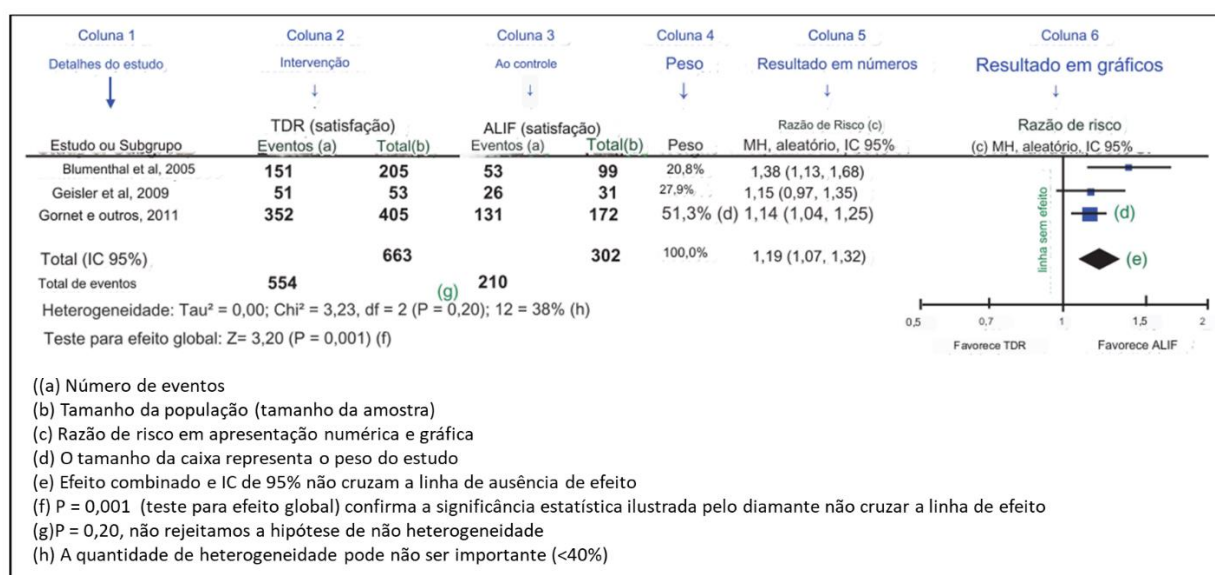
Há sete passos importantes que precisam ser observados para realizar uma meta-análise, sendo eles: 1) formulação de uma pergunta; 2) seleção dos estudos publicados; 3) avaliação dos estudos; 4) extração dos dados; 5) análise e apresentação desses dados; 6) interpretação dos dados; 7) meta-análise (BICUDO, 2014).

A meta-análise é potencialmente vantajosa para os estudos. Por meio dessa ferramenta, é possível melhorar a precisão dos estudos, uma vez que estudos demasiadamente pequenos apresentam dificuldades em fornecer evidências que sejam convincentes isoladamente para os efeitos da intervenção. Quando se baseiam em mais informações, a estimativa é melhorada. Outro ponto vantajoso é a possibilidade de responder a questões que não foram incluídas em estudos individuais. Assim sendo, a seleção de estudos que diferem em suas características

pode permitir uma investigação da consistência do efeito mais amplamente nas intervenções e populações. Além disso, por meio da meta-análise é possível gerar novas hipóteses ou resolver controvérsias que podem ser encontradas em estudos conflitantes, pois a síntese estatística dos resultados é capaz de avaliar, explorar e quantificar o grau dos conflitos, bem como as razões pelas quais foi possível encontrar os diferentes resultados nos estudos (DEEK; HIGGINS; ALTMAN, 2019).

Uma das formas de demonstrar os resultados da meta-análise é por meio de um “*forest plot*” ou gráfico de floresta. Esse tipo de gráfico fornece informações essenciais sobre a heterogeneidade dos estudos. Dados de diversos estudos primários fornecem, quando reunidos, uma estimativa que é representada pelo diamante no gráfico em floresta. Normalmente, o gráfico em floresta contém seis colunas básicas, mas outras colunas também podem ser adicionadas a fim de fornecer um maior número de informações. As colunas determinadas como básicas possuem as seguintes informações: 1) estudos incluídos, contendo subgrupos se foram analisados; 2) grupo de intervenção; 3) grupo controle; 4) peso; 5) medida de efeito do resultado (em formato numérico); 6) medida de efeito do resultado (em formato gráfico) (Figura 2) (DETTORI; NORVELL; CHAPMAN, 2021).

Figura 2 – Exemplo de informações básicas de um gráfico de floresta ou “forest plot”



Fonte: Adaptado de DETTORI; NORVELL; CHAPMAN, 2021

2.3.2 Avaliação da heterogeneidade

A heterogeneidade consiste na variabilidade da estimativa do efeito entre os estudos que estão incluídos na revisão. A heterogeneidade estatística é a variação que ocorre nos resultados dos estudos e ela pode ser clínica ou metodológica. Entretanto, uma meta-análise que apresenta uma heterogeneidade clínica significativa não necessariamente irá apresentar uma heterogeneidade estatística considerável, e nesses casos a meta-análise vai sugerir que há uma maior capacidade de generalizar os achados do trabalho e com isso há um aumento da validade externa do efeito da intervenção. A heterogeneidade clínica está relacionada à variação das características da população, nos métodos diagnósticos, nas intervenções etc., encontradas nos estudos, pois eles não são conduzidos usando o mesmo protocolo. Enquanto a heterogeneidade metodológica está relacionada às diferenças apresentadas nos desenhos dos estudos incluídos. Tanto a heterogeneidade clínica quanto a heterogeneidade metodológica são fontes de heterogeneidade estatística (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2012).

Para verificação dos efeitos da heterogeneidade nos estudos incluídos, são recomendados alguns testes estatísticos derivados do teste qui-quadrado, sendo o teste Q de Cochran e o teste de inconsistência de Higgins (I^2) os testes predominantemente utilizados. A heterogeneidade estatística pode ser avaliada: medindo a sobreposição dos intervalos de confiança de 95% e das estimativas pontuais dos estudos incluídos; avaliando o teste I^2 que serve para quantificar a magnitude da heterogeneidade; e observando o valor de P do Chi (DETTORI; NORVELL; CHAPMAN, 2021).

A magnitude da heterogeneidade pode ser definida usando o teste I^2 e tem a seguinte interpretação: 0 a 40% → pode não ser importante; 30 a 60% → pode demonstrar uma heterogeneidade moderada; 50% a 90% → pode demonstrar uma heterogeneidade substancial; 75% a 100% → demonstra uma heterogeneidade considerável (DETTORI; NORVELL; CHAPMAN, 2021).

Quando a análise realizada apresenta uma heterogeneidade significativa, mas não há uma explicação por nenhuma análise de sensibilidade, não é recomendado que se realize uma meta-análise. Sendo assim, deve-se apresentar, de maneira

individual, as estimativas dos efeitos das intervenções desses estudos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2012).

2.3.3 Análise de subgrupos

A análise de subgrupo é um método comum para realizar a avaliação das causas heterogeneidade. É uma análise sem comparação randomizada, sendo observacional por natureza, o que leva a algumas limitações. Assim, a variável que define os subgrupos dos estudos e diversas outras variáveis podem ser distintas nos subgrupos avaliados, o que limita as conclusões. Outro viés que contribui para a sua limitação é o número de subgrupos analisados, pois quanto maior o seu número, maior a probabilidade de se encontrar resultados falso-positivos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2012).

As meta-análises que utilizam análise de subgrupo podem apresentar cinco cenários, sendo eles: 1) Não existe efeito no subgrupo; 2) Não existe efeito no subgrupo, mas a heterogeneidade presente é inexplicada; 3) Existe um efeito no subgrupo quantitativo e estatisticamente significativo; 4) Existe um efeito no subgrupo qualitativo e estatisticamente significativo, com a heterogeneidade inexplicada; e 5) Existe efeito de subgrupo sendo estatisticamente significativo, mas com uma distribuição desigual da covariância (SANTOS; CARDOSO; APÓSTOLO, 2022).

As análises de subgrupos consistem em dividir todos os dados dos participantes em subgrupos para que assim seja possível realizar uma comparação entre eles. Essas análises podem ser feitas em subconjuntos de participantes, divididos por gênero, por exemplo, ou para subconjuntos de estudos, como por exemplo, localizações geográficas diferentes. Essas análises podem ser realizadas para investigar resultados heterogêneos ou para responder perguntas mais específicas sobre tipos de intervenções, grupos de pacientes ou tipos de estudo (DEEKS; HIGGINS; ALTMAN, 2019).

2.3.4 Análise de sensibilidade

A análise de sensibilidade é utilizada para fazer a comparação de estimativas resumidas de efeito. Essas comparações podem avaliar os resultados por meio de

três critérios, sendo eles: consistência de estimativas de direção; consistência das estimativas de direção e magnitude; e consistência das estimativas de direção, magnitude e precisão (ELVIK, 2005).

Se em uma RS os estudos apresentarem na meta-análise uma elegibilidade duvidosa por não conter dados completos, pode-se fazer uma análise de sensibilidade que envolverá a repetição da análise primária. Dessa forma, será realizada a meta-análise duas vezes: na primeira utilizando todos os estudos, e na segunda vez incluindo apenas os que se tem certeza da elegibilidade (DEEKS; HIGGINS; ALTMAN, 2019).

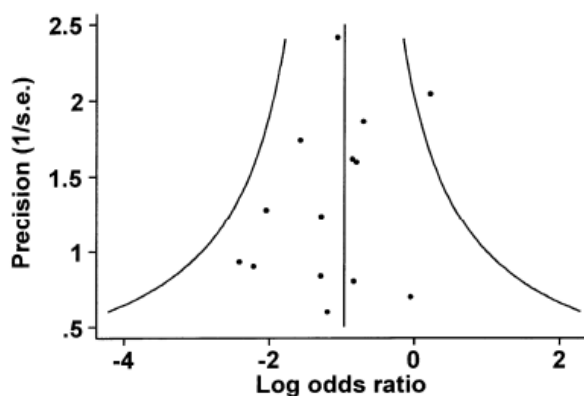
Os resultados do estudo podem ser representados com uma razão de taxas que é feita entre a razão da taxa do grupo de intervenção experimental e a taxa do grupo de comparação. Esses resultados são dados em logaritmos naturais que podem se combinar entre os estudos por meio do método genérico de variância inversa. Alternativamente, pode-se usar o método de regressão de Poisson (DEEKS; HIGGINS; ALTMAN, 2019).

2.3.5 Viés de publicação

Quando há a probabilidade de se publicar um estudo e sempre que for possível uma associação entre os estudos, o viés de publicação é encontrado. Os resultados de uma meta-análise idealmente representam a combinação entre os estudos incluídos na análise. Dessa forma, se apenas um único estudo exercer influência nas estimativas do efeito, esse problema pode ser chamado de viés de *outlier* (ELVIK, 2005).

Os resultados de uma meta-análise podem ser distorcidos pelo viés de publicação. Alguns métodos estatísticos podem auxiliar na avaliação e correção desses enviesamentos. Dentre esses métodos, pode-se citar o gráfico de funil (Figura 3), que é responsável por avaliar se os estudos pequenos possuem estimativas pontuais maiores do que os estudos grandes. Nesses casos, os métodos assumem que o viés de publicação não opera em estudos muito grandes, por não atuar nos valores de p , mas com base no tamanho das estimativas pontuais (MATHUR; VANDERWEELE, 2020).

Figura 3 – Exemplo de funnel plot ou gráfico de funil



Fonte: Adaptado de STERNE; EGGGER, 2001

O nome de gráfico de funil é devido ao fator de precisão da estimativa do efeito aumentar à medida que a amostra aumenta. Dessa forma, os estudos ficam dispersos em formato invertido registrados no gráfico quando há ausência de viés de publicação. Sendo assim, na base ficam os estudos com tamanho de amostras menores, que podem apresentar variações. À medida que os estudos com tamanho de amostra maiores são publicados, a estimativa de efeito possui uma tendência de permanecer a mesma, configurando, portanto, o vértice do funil. Se na base do funil não houver pontos ao lado direito da figura, pode ser devido à ausência de publicação de estudos negativos, os quais são aqueles que não apresentam diferenças significativas. O eixo horizontal do gráfico representa os dados estimados do que está sendo avaliado nos estudos e o eixo vertical representa as medias de precisão dos estudos em questão. Geralmente, no gráfico de funil são plotados o tamanho dos efeitos em relação ao erro padrão ou precisões (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2012; LIN; CHU, 2018; STERNE; EGGGER, 2001).

A assimetria no gráfico de funil nem sempre é resultado da presença de um viés. Ela pode ocorrer devido à heterogeneidade, irregularidade nos dados, ou ainda a algum artefato casual (STERNE; HARBORD, 2004).

No gráfico de funil pode ser avaliado o viés da publicação, examinando de maneira intuitiva a assimetria do gráfico; no entanto, esse tipo de avaliação é bastante

subjetivo. Portanto, há testes estatísticos propostos com o objetivo de realizar essa avaliação, como o teste de *Begg* e o teste de regressão de *Egger*. O teste de *Begg* examina a correlação entre o tamanho dos efeitos e suas variâncias amostrais correspondentes, quando há a presença de uma forte correlação, isso é sugestivo de viés de publicação. E o teste de regressão de *Egger* faz a diminuição do tamanho dos efeitos padronizados utilizando suas precisões, quando o intercepto da regressão é zero, significa que há ausência de viés de publicação (LIN; CHU, 2018).

Outra abordagem para detecção do viés de publicação é o modelo de seleção em que há o uso da distribuição ponderada a fim de modelar o processo de seleção e determinar quais serão os desenvolvimentos de estimativa que servirão para levar em conta o processo de seleção. Os modelos de seleção são geralmente mais complicados, o que acaba por limitar a sua aplicabilidade. Para corrigir distorções de publicação, ele incorpora funções de peso. A validade dos resultados ajustados encontrados nesse modelo pode ser duvidosa, sendo esse método aplicado geralmente como análise de sensibilidade (LIN; CHU, 2018).

2.3.6 Avaliação da qualidade da evidência

A avaliação da qualidade consiste em verificar a correspondência entre as técnicas e os métodos utilizados nos estudos, bem como das conclusões observadas (FIGUEIREDO FILHO *et al.*, 2015).

Quando utilizado o termo “qualidade” na literatura clínica, ele se refere a um julgamento sobre o risco de viés de um estudo individual (BALSHEM *et al.*, 2011). O *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation* (GRADE) desenvolveu um sistema rigoroso de recomendações para classificação da qualidade das evidências de pesquisa e uso de testes (SCHUNEMANN *et al.*, 2008).

A metodologia de GRADE é amplamente utilizada e endossada por grandes organizações como a Organização Mundial de Saúde (OMS), o *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE) e a *Cochrane*. Para ensaios randomizados e para estudos observacionais com baixa qualidade de evidência, o GRADE estabelece um ponto de alta certeza de evidência que é o chamado qualidade da evidência. Estudos individuais ou grupos de estudos com a estrutura semelhante ao PICO podem ter

redução ou aumento nas suas evidências devido a uma série de parâmetros. Um ensaio clínico randomizado pode ser considerado como de baixa qualidade de evidência quando apresentar baixa qualidade e um estudo observacional pode fornecer resultados de elevada certeza quando tiver alta qualidade. As classificações de qualidade são realizadas após a avaliação das evidências e podem ter seu resultado classificado como: muito baixo, baixo, moderado e alto (ANTONIOU; ANTONIOU, 2020).

Os parâmetros capazes de aumentar ou reduzir a certeza de evidência são: desenho do estudo, avaliação do risco de viés, inconsistência, imprecisão, publicação de viés, grande efeito e confusão plausível (ANTONIOU; ANTONIOU, 2020).

2.3.7 Revisão sistemática neste estudo

Inicialmente, o presente estudo foi proposto com o objetivo de comparar a análise de miRNAs em amostras de sangue de gestantes com PE internadas na Maternidade Odete Valadares e nas unidades de saúde com a análise em gestantes normotensas internadas nos mesmos locais.

No entanto, no início de 2020, quando as coletas iniciariam de maneira longitudinal, teve início a pandemia da Covid-19, o que levou à suspensão das atividades presenciais tanto na Universidade, como nas maternidades, o que inviabilizou a realização do estudo proposto. Dessa forma, a realização da RS tornou-se uma alternativa relevante e exequível. Certamente, a realização dessa RS vai contribuir para responder e direcionar o que está publicado sobre os microRNAs na PE, o que vai ampliar o conhecimento dessa doença tão desafiadora e, principalmente, com potencial para reverter em benefícios para as gestantes.

2.4 MicroRNAs (miRNAs)

Os microRNAs (miRNAs) foram inicialmente descobertos em 1993 no nematoide *Caenorhabditis elegans* (BHASKARAN; MOHAN, 2014). O primeiro miRNA descoberto foi o lin-4, o que revolucionou a pesquisa no campo da biologia molecular. Alguns anos antes, o laboratório de Horvitz, caracterizou o lin-4 como um dos genes responsáveis pela regulação do desenvolvimento temporal das larvas de *C. elegans*. Em 1987, o mesmo grupo de pesquisa descobriu uma mutação presente no lin-4 que possuía um fenótipo oposto a mutação de outro gene, o lin-14. Mais tarde, descobriu-se que lin-4 não era um RNA codificador de proteínas e sim um pequeno RNA não codificador. Diante de mais estudos, os pesquisadores propuseram que o lin-4 regulava o lin-14 a nível pós transcricional. Desde então, foram detectados diversos miRNAs em todos os sistemas de modelos animais e inclusive alguns deles demonstram ter um alto grau de conservação entre as espécies (O'BRIEN *et al.*, 2018).

MiRNAs são pequenos RNAs não-codificantes, com tamanhos aproximados de 22 nucleotídeos. São caracterizados por alta estabilidade, comparados aos mRNAs e possuem meia vida longa. Eles atuam na regulação pós-transcricional na expressão gênica (LV *et al.*, 2019).

Grande parte dos miRNAs são originados a partir de sequências de DNA que se convertem em miRNAs primários (pri-miRNAs), que por sua vez são processados e transformados em miRNAs precursores (pré-miRNAs) e, posteriormente, em miRNAs maduros. Em geral, os miRNAs interagem com o 3'UTR dos RNAs mensageiros (mRNAs) alvos para inibir a expressão. No entanto, também foi relatada a interação de miRNAs com outras regiões, como a 5'UTR, a sequência de codificação e os promotores de genes. Além disso, foi demonstrado que, sob certas condições, os miRNAs ativam a expressão gênica. Alguns estudos sugerem que os miRNAs são transportados entre diferentes compartimentos subcelulares com o objetivo de monitorar a taxa de tradução e até mesmo a transcrição (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Como mencionado anteriormente, os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs) e estão relacionados a expressão de mRNA. Sendo assim, quando há mudanças na expressão de miRNA pode haver a indução de uma variação

nos níveis de mRNA, o que pode influenciar na homeostase celular. Os miRNAs desempenham um papel crucial no desenvolvimento humano já que participam de diversos processos biológicos, incluindo a proliferação, diferenciação e morte celular, e também influenciam nas respostas imunológicas. A maioria dos miRNAs é gerada a partir da transcrição de sequências de DNA em miRNAs primários que passam pelo processo de maturação para se tornarem miRNAs maduros (GIANNUBILO *et al.*, 2024; MOHD ISA *et al.*, 2023).

Após a sua montagem, os miRNAs podem permanecer nas células ou podem ser liberados para o exterior das células, tanto sob condições normais quanto patológicas. Esses miRNAs, chamados de miRNAs circulantes, estão fortemente presentes nos fluidos corporais, sendo encontrados na urina, saliva e suco gástrico. Porém, o plasma e o soro são mais frequentemente coletados para avaliação de seus níveis, tanto em indivíduos saudáveis quanto não saudáveis e, por esse motivo, se tornam promissores para a sua utilização como biomarcadores para doenças (GIANNUBILO *et al.*, 2024).

Os miRNAs circulantes têm recebido atenção nos últimos anos devido à sua semelhança com fatores de sinalização clássicos: como fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Esses miRNAs circulantes são muito estáveis e capazes de funcionar como supressores contra o mRNA alvo nas células receptoras. Alguns estudos demonstraram que miRNAs humanos isolados em soro e plasma são resistentes à atividade de RNase; por outro lado, os miRNAs sintetizados exogenamente, projetados para aumentar a presença no sangue, degradam-se rapidamente, sugerindo que a integridade do miRNA circulante endógeno depende de um fator diferente de sua estrutura ou comprimento curto (GIANNUBILO *et al.*, 2024).

Os miRNAs desempenham papel funcional em processos importantes na gestação, como placentação, angiogênese e proliferação de trofoblastos. Dessa maneira, eles podem oferecer uma nova compreensão no mecanismo da PE e a possibilidade de uso como marcadores de prognóstico e identificação e risco (AKEHURST *et al.*, 2015).

Desde a descoberta do lin-4, primeiro miRNA, milhares de miRNAs foram identificados em uma variedade de espécies por meio de abordagens computacionais

ou experimentais (GAO; JIANG, 2016). Estabelecer o perfil de expressão de miRNAs se tornou crucial para o processo de investigação das funções biológicas e aplicações clínicas dos miRNAs. Várias abordagens são importantes para o estabelecimento de identificações de miRNA, como por exemplo: biblioteca de DNA complementar (cDNA), computação para previsão de miRNA, métodos baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR), técnicas baseadas em quantificação de miRNA (*microarray*), sequenciamento e reação em cadeia polimerase quantitativa (qPCR) (GAO; JIANG, 2016).

Cada uma das abordagens citadas anteriormente para a quantificação e identificação dos miRNAs possui vantagens e desvantagens. Para a escolha do melhor método que se encaixe à necessidade do estudo, deve ser considerada a aplicação clínica em relação ao custo, a eficácia e a possibilidade de reprodutibilidade intra e interlaboratorial. A padronização dos métodos, as diretrizes para o preparo das amostras e coletas das mesmas devem ser bem estabelecidas. Um grande desafio no meio clínico para a utilização dos miRNA consiste na padronização de protocolos para a extração de miRNA das amostras biológicas normalizando os valores a serem medidos e os controles a serem utilizados. Porém, com o rápido avanço do desenvolvimento das ferramentas utilizadas para o estudo do perfil de miRNA, o uso futuro será cada vez mais possível para a compreensão do uso de miRNA como alvos de diagnóstico e terapêuticos para diversas doenças humanas (GAO; JIANG, 2016).

É importante ressaltar que a relevância dos miRNAs na gravidez tem sido cada vez mais explorada, uma vez que essas moléculas estão presentes em abundância na placenta humana. A regulação temporal na placenta necessita da expressão gênica, que desempenha um papel importante nos mecanismos de seu desenvolvimento. Além disso, há evidências de que os componentes da biogênese do miRNA, Droscha e Dicer, estão presentes nas células trofoblásticas (SHEIKH *et al.*, 2016).

2.4.1 Nomenclatura dos miRNAs

Para garantir a catalogação dos miRNAs e a sua uniformidade, assumiu-se um sistema uniforme de nomenclatura. Os miRNAs são numerados de maneira sequencial, de acordo com a ordem em que foram descobertos. Todos aqueles que

possuem sua confirmação, por meio de experimentos, recebem um número anexado ao prefixo “miR” seguido por um travessão. No caso de nomes, como por exemplo o caso do hsa-miR-21, as 3 primeiras letras, “has” indicam o organismo, que nesse caso é o *Homo sapiens*. Nomes com o “R” maiúsculo (miR-21) refere-se ao miRNA maduro, enquanto o com “r” minúsculo se refere tanto ao gene do miRNA quanto ao componente previsto ao seu transcrito primário, também chamado de miRNA precursor (BHASKARAN; MOHAN, 2014).

Sequências de miRNA maduras idênticas que vêm de sequências precursoras separadas e loci genômicos são designadas com identificadores que incluem um sufixo numérico, como hsa-miR-219-1 e hsa-miR-219-2. Por contraste, sequências maduras semelhantes que diferem por 1 ou 2 nucleotídeos são rotuladas com um sufixo contendo letras. Assim, hsa-miR-130a e has-miR-130b são originários dos precursores hsa-mir-130a e hsa-mir-130b, respectivamente, por exemplo (BHASKARAN; MOHAN, 2014).

Atualmente, diversas bases de dados disponíveis coletam informações sobre a relevância dos miRNAs em diversas doenças. O miR2Disease é um dos bancos de dados que possui informações bem completas sobre a desregulação de miRNAs em diversas doenças humanas (SALIMINEJAD *et al.*, 2019).

2.4.2 Biogênese dos miRNAs

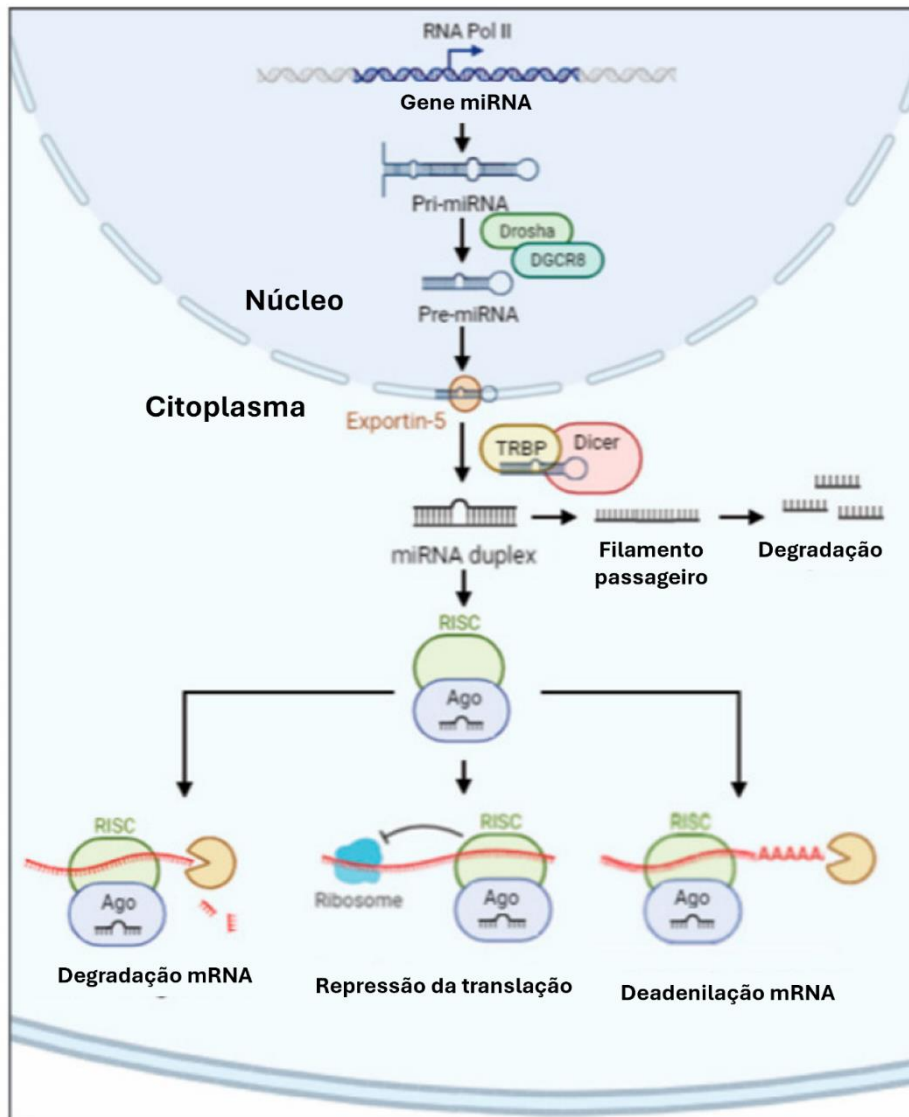
A formação do miRNA passa por várias fases, incluindo a transcrição dos transcritos primários do miRNA, o processamento no núcleo pela Drosha, a exportação nucleocitoplasmática, o processamento citoplasmático pelo Dicer e a formação do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) com as proteínas Argonaute (Ago) (MATSUYAMA; SUZUKI, 2019).

O processo de produção do miRNA começa com o processamento dos transcritos da RNA polimerase II/III pós ou co-transcricionalmente. Atualmente, aproximadamente metade dos miRNAs já identificados são intragênicos e processados principalmente a partir de íntrons e poucos éxons de genes codificadores de proteínas. Enquanto o restante é intergênico, sendo transcritos independentemente de um gene hospedeiro e regulados por seus próprios

promotores. Os miRNAs também podem ser transcritos na forma de uma longa transcrição, que recebe o nome de *clusters*, podendo ter regiões de descendência semelhantes e, com isso, serem considerados uma família. O processo de biogênese pode ser classificado em vias canônicas e não canônicas (O'BRIEN *et al.*, 2018).

De maneira geral, a biossíntese de miRNA produz transcritos de pri-miRNA a partir dos genes de miRNA codificados seja em regiões intrônicas, exônicas ou intergênicas. No núcleo, o pri-miRNA é digerido em pré-miRNA pelo Drosha e DGCR8. Sendo assim, o pré-miRNA é então conduzido para o citoplasma por meio do complexo Exportina-5 – Ran-GTP. Ao se obter o comprimento maduro, a proteína Ago2 é carregada com a cadeia funcional no complexo RISC silenciando o alvo do mRNA por meio da morte do mRNA, da degradação ou da repressão traducional (Figura 4) (GIANNUBILO *et al.*, 2024).

Figura 4 - Biossíntese de miRNA



Fonte: Adaptação de GIANNUBILO et al., 2024

2.4.2.1 Vias canônicas

Os miRNAs intergênicos têm seus próprios promotores independentes e são transcritos de maneira separada. Alguns deles compartilham um promotor com os genes hospedeiros, enquanto outros são cotranscritos em uma única unidade de pri-miRNA, assim como as unidades policistrônicas. As sequências maduras do miRNA estão presentes em íntrons ou éxons de RNAs não codificantes, muitos são gerados a partir de íntrons (mirtron) de pré-mRNAs. A maioria dos genes de miRNAs são transcritos pela Pol II, como pri-miRNAs maiores, contendo pelo menos uma estrutura

em formato de alça. Todos os pri-miRNAs canônicos possuem um cap 5', mas podem não ter um sinal de poliadenilação na extremidade 3' (SALIMINEJAD *et al.*, 2019).

No núcleo, os pri-miRNAs são clivados em pré-miRNAs, uma estrutura de haste-alça de cerca de 70 nucleotídeos, por um complexo chamado microprocessador, composto por Drosha e pelo gene 8 da região crítica da síndrome de DiGeorge (*DGCR8*). Drosha é um membro das enzimas RNase III que são ribonucleases endonucleolíticas específicas de RNA de fita dupla. *DGCR8* é uma proteína de ligação ao RNA de fita dupla que atua como a subunidade não catalítica do complexo microprocessador. Os pré-miRNAs são então exportados para o citoplasma por XPO5 e pela proteína nuclear RAN, uma pequena proteína de ligação ao GTP. O XPO-5 pode proteger os pré-miRNAs nucleares da degradação (GIANNUBILO *et al.*, 2024; SALIMINEJAD *et al.*, 2019).

2.4.2.2 Vias não canônicas

Os miRNAs que são produzidos contrariamente à via da biogênese canônica são chamados de não canônicos. Eles foram descobertos por contornarem uma ou mais etapas da via canônica e se originarem de diversas fontes (MOHD ISA *et al.*, 2023).

Diversas formas não canônicas da biogênese de miRNAs já foram elucidadas. Essas diferentes vias utilizam diversas proteínas da via canônica, como *Drosha*, *Dicer*, *exportina 5* e *AGO2*. De maneira geral, a biogênese não canônica de miRNA pode ser dividida em vias independentes de Drosha/*DGCR8* e independentes de *Dicer* (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Os pré-miRNAs gerados pela via independente de Drosha/*DGCR8* se parecem com os substratos de *Dicer*. Um exemplo desses pré-miRNAs são os mirtrons, que são produzidos a partir dos íntrons do mRNA durante o *splicing*. Outra forma é o pré-miRNA encapsulado com 7-metilguanossina (m7G). Esses RNAs recém-formados são exportados diretamente para o citoplasma através da exportina 1, sem a necessidade de clivagem pela *Drosha*. Existe uma tendência a favor da cadeia 3p, possivelmente devido ao cap m7G que dificulta a incorporação da cadeia 5p no Argonaute (MOHD ISA *et al.*, 2023; O'BRIEN *et al.*, 2018).

Por outro lado, os miRNAs que não dependem de Dicer são processados por Drosha a partir de transcritos endógenos de RNA em forma de gancho curto (shRNA). Os pré-miRNAs resultantes requerem a presença de AGO2 para que sua maturação seja concluída no citoplasma, uma vez que são muito curtos para serem processados por Dicer. Esse processo leva ao carregamento completo do pré-miRNA em AGO2, seguido pelo corte dependente de AGO2 da cadeia 3p. O corte 3'-5' da cadeia 5p finaliza sua maturação (O'BRIEN *et al.*, 2018).

2.4.3 Mecanismo de ação dos miRNAs

Para desempenhar sua função, o miRNA se conecta aos mRNAs-alvo, identificando padrões complementares de sequências e modulando o padrão de tradução de proteínas desses mRNAs. A interação entre eles pode ser total ou parcial, sendo que quanto maior for a complementariedade das sequências, mais intensa e duradoura será essa ligação. Os miRNAs desempenham um papel fundamental como reguladores da expressão gênica, com um mecanismo dinâmico, influenciado pela localização dessas moléculas e pelos métodos de interação com seus alvos (O'BRIEN *et al.*, 2018).

São diversas as etapas que envolvem a participação de várias proteínas no mecanismo de atuação dos miRNAs. Os miRNAs se ligam ao alvo na região 3' não traduzida (UTR), podendo se ligar em outras regiões como a 5'UTR ou regiões promotoras do mRNA-alvo. O miRNA pode atuar inibindo a expressão gênica ao impedir a tradução do mRNA-alvo em proteínas. No entanto, se o miRNA se ligar à região promotora de um gene pode levar à ativação da expressão do gene (JORGE *et al.*, 2021).

O reconhecimento do alvo acontece principalmente pelo emparelhamento de bases entre a sequência inicial do miRNA (nucleotídeos 2-8) e os locais localizados na região 3' não traduzida (3'-UTR) dos mRNAs alvo. Além disso, o direcionamento pode ser auxiliado por elementos de sequência adicionais, como a presença de uma adenina não pareada na sequência alvo do mRNA, correspondendo ao nucleotídeo 1 na extremidade 5' do miRNA maduro. Esses locais de sete a oito nucleotídeos são responsáveis pela maior parte da regulação por cada miRNA, sendo os principais alvos identificados pelas ferramentas de previsão de alvos mais precisas. Em

situações menos comuns, ocorre um emparelhamento adicional na região 3' entre o mRNA alvo e a extremidade 3' do miRNA, envolvendo os nucleotídeos 13-16 do miRNA, o que complementa a correspondência com a região inicial de forma menos eficaz (SALIMINEJAD *et al.*, 2019).

Cada mRNA pode ter como alvo mais de um miRNA, por esse motivo quando se quer entender os efeitos do miRNA deve-se ponderar a sua interação com o mRNA-alvo. O efeito biológico causado é dependente da ação dos efeitos dos miRNAs que são expressos na mesma célula. Sendo assim, um miRNA pode estar relacionado a regulação oposta em diversos tipos celulares, pois pode aumentar a vigilância celular, a taxa de apoptose, por exemplo, além de que níveis semelhantes de miRNA podem não ter o mesmo efeito biológico, pois depende dos alvos e da interação com outras moléculas (JORGE *et al.*, 2021).

Na literatura, há registros de estudos que revelaram a regulação genética mediada por miRNA de maneira dinâmica ajudando a tamponar, para um estado estacionário, a expressão gênica. Recentemente, há uma compreensão mais abrangente de como funciona a dinâmica do miRNA, sendo de natureza altamente robusta no que diz respeito à regulação gênica mediada por miRNAs. A compartimentalização funcionalizada e o transporte do miRISC dentro das células são fatores que contribuem para a robustez dessa regulação gênica (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Alguns dados experimentais demonstraram que os miRNAs são liberados para fora da célula sob quatro diferentes formas: (1) combinados à proteína Argonaute2; (2) ligados à proteína nucleofosmina de ligação ao RNA (NPM1); (3) ligados à lipoproteína de alta densidade (HDL); e (4) fechados dentro de vesículas extracelulares (EVs) como microvesículas e exossomos. De acordo com o que foi sugerido em resultados de pesquisas envolvendo linhas celulares e amostras biológicas humanas, a presença de uma forma de miRNA extracelular não exclui a presença de outra forma (GIANNUBILO *et al.*, 2024).

Os miRNAs circulantes que são detectados no plasma e que não estão em EVs estão ligados a proteínas. A proteína Ago2, além de participar da maturação do miRNA via complexo RISC, também tem efeito protetor nos miRNAs extracelulares contra a ação de RNAses. Alguns estudos sugeriram que o complexo Ago2-miRNA

pode modular a expressão gênica nas células receptoras. O NPM1 também desempenha um papel protetor para os miRNAs circulantes. Alguns estudos levantaram a hipótese de que o NPM1, além de estar envolvido no empacotamento e na liberação dos miRNAs para fora da célula, também permanece ligado aos miRNAs na circulação periférica. Entretanto, a função biológica dos miRNA relacionados às proteínas Ago2 e NPM1 ainda permanece desconhecida na gravidez, bem como nas doenças que estão relacionadas a ela (GIANNUBILO *et al.*, 2024).

2.4.4 Revisões sistemáticas na literatura

Recentemente, os miRNAs circulantes têm despertado interesse na pesquisa científica por agirem de forma semelhante à sinalização clássica, composta por fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Esses miRNAs circulantes demonstram uma notável estabilidade e são competentes para exercer sua função inibitória sobre o mRNA alvo nas células receptoras (GIANNUBILO *et al.*, 2024).

A literatura possui diversos estudos de revisões sistemáticas relacionando os miRNAs a diferentes doenças ao longo dos anos. A importância do conhecimento sobre os miRNAs e a sua relação com as doenças vem crescendo exponencialmente. Diante disso, foram selecionadas algumas revisões sistemáticas mais recentes, com as publicações datadas entre os anos de 2023 e 2024, para exemplificar os avanços conhecidos nessas áreas envolvendo diversas doenças.

O carcinoma espinocelular oral (CEC) se trata de uma doença maligna relacionada à cavidade oral e que possui mau prognóstico. Sabe-se que esse mau prognóstico está relacionado à desregulação nas vias glicolíticas envolvendo transportadores de glicose (GLUT), sendo a expressão de GLUT nas células cancerígenas regulada por vários miRNAs. Por esse motivo, foi realizada uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar o papel do miRNA na expressão de GLUT em casos de CEC. Foram encontradas evidências da relação do miRNA na regulação do GLUT, especialmente GLUT1 e GLUT3 no câncer de cavidade oral (YUWANATI *et al.*, 2023).

Diante disso, alguns dados encontrados na revisão sobre o CEC foram: ao comparar amostras de tecidos saudáveis e amostras tumorais foi encontrada uma

regulação positiva de GLUT3 na linhagem celular associada à supressão da captação glicose nas amostras tumorais; há registros de que o Circ_100290 age mediando o silenciamento do miRNA378a, o que leva à regulação positiva do GLUT1, que facilita o aumento de glicose e conseqüentemente de proliferação celular; a superexpressão do miRNA 378a-3p induz a sinalização proliferativa nas células do câncer de cavidade oral; o miRNA-675-5p faz a amplificação da via glicolítica, o que leva à proliferação de fibroblastos associados ao câncer e inibe o crescimento tumoral (YUWANATI et al., 2023).

O transplante de fígado é capaz de salvar vidas de pacientes com doenças hepáticas em estágio terminal, porém a rejeição aguda e as complicações devido aos enxertos permanecem como sendo grandes desafios pós-operatórios. Ter um diagnóstico preciso e precoce é primordial nesses casos. Porém, utiliza-se de biópsias, que são processos invasivos, para se chegar ao diagnóstico de rejeição. Diante disso, os miRNAs podem ser biomarcadores promissores para a precocidade dessa rejeição aguda e com isso gerar intervenções melhores e mais assertivas sem a necessidade de se utilizar técnicas invasivas. Nesse contexto, a revisão sistemática de Koch e colaboradores (2024) aborda estudos que analisaram os miRNAs como biomarcadores para a rejeição aguda e para a disfunção do enxerto no transplante de fígado (KOCH *et al.*, 2024).

Essa revisão avaliou 13 estudos em que vários miRNAs foram investigados, como: miR-122, miR-155, miR-181, miR-483-3p e miR-885-5p. Esses miRNAs estavam regulados positivamente nos casos de rejeição celular e com isso se mostraram como potenciais biomarcadores. Alguns desses estudos conduziram análises de gene alvo, outros foram capazes de prever as diferentes complicações pós-transplante no órgão transplantado, porém, os autores concluíram que mais estudos devem ser realizados a fim de traçar melhor padrão para o diagnóstico (KOCH *et al.*, 2024).

Outra revisão sistemática abordou o diabetes *mellitus* gestacional (DMG), que é uma complicação grave que acomete mulheres durante a gravidez e que afeta tanto a mãe quanto a criança. Além das possíveis complicações durante a gestação, mulheres que sofrem com DMG possuem maior risco de desenvolvimento da diabetes *mellitus* do tipo 2 ao longo da vida. A identificação de qualquer sinal precoce para o

DMG ajuda a prevenir a doença nas mulheres que apresentam alto risco. Essa revisão sistemática e meta-análise visou a investigação de miRNAs que pudessem estar associados ao DMG ao comparar amostras de casos de DMG com controles normoglicêmicos (DINESEN *et al.*, 2023).

Nesse estudo, após realizada a triagem, foram selecionados 35 artigos que foram avaliados e tiveram seus dados extraídos. Uma meta-análise foi realizada para as espécies de miRNAs: miR-16, miR-17, miR-29a, miR-103, miR-122, miR-125, miR-132, miR-134, miR-155, miR-210, miR-222, miR-223 e miR-330. Apesar de alguns miRNAs terem apresentado uma considerável variabilidade nos estudos, foi observado que miR-29a, miR-330, miR-134, miR-16, miR-223 e miR-17 exibiram, em geral, uma regulação positiva significativa no DMG. Por outro lado, os níveis de miR-132 e miR-155 diminuíram nos pacientes com DMG, indicando a necessidade de mais pesquisas sobre esses miRNAs como possíveis biomarcadores para a detecção precoce do DMG (DINESEN *et al.*, 2023).

2.4.5 Revisões sistemáticas sobre a associação entre microRNAs e pré-eclâmpsia

Os miRNAs podem desempenhar papel crucial na patogênese da PE, pois as moléculas participam ativamente dos processos envolvidos na implantação durante os estágios iniciais da gravidez (GIANNUBILO *et al.*, 2024).

Em 2016, Sheik e colaboradores publicaram uma revisão sistemática visando a investigação dos miRNAs na PE. Foram extraídas e comparadas informações de 58 estudos para que fossem identificados quais os miRNAs seriam os mais promissores relacionados à patogênese da PE. Os estudos utilizados foram datados de março de 2007 a dezembro de 2015. A fim de abordar quais os miRNAs poderiam contribuir para a patogênese da PE, determinou-se quais eram os miRNAs mais frequentemente detectados utilizando padrões demonstráveis de expressão diferencial significativa em todos os estudos que foram incluídos após a triagem. Foram selecionados 20 miRNAs que na literatura selecionada foram mais frequentemente expressos diferencialmente (SHEIKH *et al.*, 2016).

Sabe-se que a PE é uma doença em que diversas vias patogênicas se convertem para fenótipos similares. Ultimamente, uma série de pesquisas, sobre a

expressão de miRNAs na PE vêm surgindo e com isso há o crescimento constante de dados ainda sem consenso definido sobre quais os miRNAs mais influenciam na patogênese da PE. No entanto, e com a diversidade metodológica presente nos estudos, determinados miRNAs apareceram de forma consistente e parecem estar fortemente ligados à PE. Vários desses miRNAs discutidos nesse artigo, como o miR-210, miR-223 e miR-126/126*, têm impacto em diversas condições de saúde. Por meio de estudos selecionados, cada um deles pode estar associado a algum mecanismo proposto na patogênese da PE (como é o caso da relação com a hipóxia e a via HIF-1 α /miR-210/ISCU, que leva a anormalidades mitocondriais) (SHEIKH *et al.*, 2016).

Outros miRNAs relacionados à PE se agrupam em famílias específicas com padrões de expressão principalmente placentários, como é o caso do miR-515, que está concentrado no expansivo C19MC específico dos primatas. Mudanças epigenéticas podem ser cruciais para a expressão anômala desse agrupamento. Esse conjunto com impressão paterna, cujos membros parecem ser abundantes em exossomas secretados, poderia ser um meio pelo qual o feto influencia nas respostas imunes maternas adversas (SHEIKH *et al.*, 2016).

Apesar de frequente associação com a PE, diversos miRNAs C19MC, incluindo o miR-518b, não possuem ainda a confirmação de genes-alvos, exceto nos casos relacionados ao câncer. Foi sugerido que alguns miRNAs estão relacionados com a gravidade da doença, como é o caso dos miR-181, miR-210 e o miR-223. Além disso, alguns conjuntos e grupos de miRNAs estão estreitamente ligados à forma da PE com sinais de gravidade, como é o caso da família dos miRs-15 e do conjunto miR-106a/363, em que estão incluídos o miR-195 e o miR-16. É importante aprofundar os estudos a fim de definir e esclarecer definições para a PE com a ligação dos miRNAs com as vias patogênicas, como é o caso do IL-6/miR-223/STAT3. Os padrões de expressão desses miRNAs podem ser úteis para que correlacione os processos patológicos às categorias específicas de gestantes com PE (SHEIKH *et al.*, 2016).

Os miRNAs que estão associados à PE têm o potencial de atuar como marcadores biológicos para doença. Uma possibilidade seria desenvolver conjuntos com base nesses pequenos RNAs, capazes de auxiliar na predição de risco e indicar o início e/ou gravidade da PE. No âmbito terapêutico, a regulação temporária da

expressão de genes envolvidos em vias ligadas à patogênese, por meio de miméticos e inibidores de pequenos RNAs, também pode ser clinicamente benéfica, assim como observado com os miméticos do pequeno RNA-126 e a via PIK3R2/PI3K/Akt associada à angiogênese. No entanto, a falta de consenso atual entre os estudos sobre os miRNAs ligados à PE restringe a possibilidade de um valor clínico prático e mais generalizado. Em última análise, qualquer valor clínico depende da resolução dos desafios metodológicos atuais, que podem ser responsáveis pela variabilidade nos resultados, permitindo uma maior padronização entre as pesquisas (SHEIKH *et al.*, 2016).

Em 2021, o grupo de pesquisa de Cirkovic realizou uma revisão sistemática juntamente com uma meta-análise com o objetivo de determinar se as mulheres com PE possuíam alterações nas expressões de miRNAs em comparação às gestantes sem PE. Foram incluídos 229 estudos para a revisão sistemática e 53 na meta-análise. Os estudos eram datados até outubro de 2021.

Nesse estudo em questão, foram encontrados níveis de expressão de miRNAs significativamente aumentados em gestantes com PE ao comparar com gestantes sem PE dos seguintes miRNAs: miRNA-16, miRNA-20b, miRNA-23a, miRNA-29b, miRNA-155 e miRNA-210. Além disso, foram encontrados níveis significativamente menores de miRNA-376c. Já no sangue periférico dessas gestantes com PE foram encontrados níveis aumentados de expressão do miRNA-155, enquanto o nível de expressão do miRNA-16 no sangue periférico das gestantes com PE foi significativamente menor. Os papéis funcionais dos miRNAs também foram apresentados nesse artigo, incluindo o controle do metabolismo celular, a angiogênese, a proliferação trofoblástica, a migração, a invasão, diferenciação e apoptose (CIRKOVIC *et al.*, 2021).

São diversos os miRNAs que contribuem para que haja o processo de proliferação, de invasão e de diferenciação trofoblástica. O miRNA-210 e o miRNA-125b-1-3p atuam inibindo a proliferação e a invasão trofoblástica, enquanto o miRNA-155 inibe apenas a invasão trofoblástica. Já miRNA-20b e miRNA-29b, nas placentas de mulheres com PE em comparação com mulheres sem PE, estão aumentados. O gene alvo dos miRNAs miRNA-20 e miRNA-16 é o VEGF, fato que pode afetar a vasculogênese placentária. Além disso, é possível que ocorra uma apoptose

excessiva como resultado da diminuição nas expressão do miR-376c (CIRKOVIC *et al.*, 2021).

Os miRNAs possuem um papel significativo na fisiopatologia da PE. As funções dos microRNAs que são prejudicadas em gestações com PE englobam o controle da proliferação do tecido trofoblástico, sua migração, invasão, apoptose, diferenciação, metabolismo e formação de novos vasos sanguíneos. Identificar miRNAs com expressão diferenciada no sangue da mãe abre caminho para estabelecer um biomarcador de fácil aplicabilidade para a PE. Nesse contexto, compreender melhor o papel dos microRNAs no desenvolvimento da PE sugere um grande potencial para o surgimento de novas ferramentas preditivas e terapêuticas para essa condição (CIRKOVIC *et al.*, 2021).

Diante dessas informações, apresentadas por essas duas revisões sistemáticas, é possível perceber a importância de se realizar uma nova revisão sistemática para que as informações sejam complementadas. Embora essas revisões sejam recentes, se faz necessária uma atualização dos dados, visto que no decorrer dos anos, até os dias atuais, já existem muitas atualizações sobre as informações dos miRNAs relacionados à PE, sendo um dos motivos desse presente trabalho enriquecer o que já se encontra na literatura e, inclusive, atualizar os dados. Além disso, essas revisões não possuem avaliação da expressão de microRNAs levando em consideração as classificações (precoce e tardia) da PE, e nem em comparação aos trimestres gestacionais.

Portanto, tendo em vista a complexidade da PE, os diferentes prognósticos e desfechos relacionados aos tipos de classificação, realizar uma revisão sistemática que engloba todas essas informações reflete em um trabalho muito mais completo e que pode contribuir melhor para a implementação clínica desses microRNAs.

2.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS NA PRÉ-ECLÂMPسيا

Nosso grupo de pesquisa estuda PE há mais de uma década com o objetivo de detectar possíveis biomarcadores sanguíneos de hemostasia (ALPOIM *et al.*, 2015; DUSSE, LUCI *et al.*, 2011; DUSSE, LUCI MARIA *et al.*, 2013; LUCENA *et al.*, 2019; PINHEIRO *et al.*, 2014), inflamação (PERUCCI *et al.*, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2013), e disfunção endotelial (ALPOIM *et al.*, 2014, 2018; ALPOIM; GODOI; *et al.*, 2013) que podem ser úteis para a avaliação da PE. Até o presente momento, apenas o surgimento de hipertensão (>140 mmHg sistólica ou >90 mmHg diastólica) após 20 semanas de gestação, associada ou não a proteinúria e/ou evidências de comprometimento multissistêmico (como disfunções renais, hepáticas e neurológicas) é o critério utilizado para estabelecer o diagnóstico desta doença gestacional (ACOG, 2020). É importante ressaltar que a PE afeta de 2 a 8% de todas as gestações em todo o mundo e a detecção precoce da doença, antes da ocorrência de comprometimento sistêmico, ainda é desafiadora, o que motiva a nossa equipe a buscar por marcadores laboratoriais de auxílio à predição da PE (DULEY, 2009; KHAN *et al.*, 2006).

Nesse contexto, os tópicos a seguir visam apresentar alguns marcadores genéticos e bioquímicos que foram alvos de estudo durante a realização do presente trabalho.

2.5.1 Óxido nítrico, ADMA e DDAH2

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina pelas NO sintases (NOS), atua como um potente vasodilatador e importante regulador da resistência vascular (MONCADA; HIGGS, 2006). Foi demonstrado que a disponibilidade diminuída de NO está associada a mecanismos fisiopatológicos da PE (METZGER *et al.*, 2013; SANDRIM *et al.*, 2008). Nesse contexto, foi demonstrado que polimorfismos do gene endotelial NOS (*NOS3*) afetam marcadores de formação de NO (níveis de nitrito) em indivíduos saudáveis (OLIVEIRA-PAULA *et al.*, 2016) e em doenças, incluindo hipertensão (MUNIZ *et al.*, 2012) e PE (ALPOIM *et al.*, 2014). Além disso, descobriu-se que os polimorfismos da *NOS3* estão associados ao risco de PE (SIROEN *et al.*, 2006). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que os polimorfismos *NOS3* G894T (rs1799983) e o número variável de repetições em tandem (VNTR) de

27 pb no íntron 4 estão associados à PE grave tardia e precoce, respectivamente (ALPOIM *et al.*, 2014). Contudo, outros parâmetros podem afetar os níveis de NO além dos polimorfismos no gene *NOS3*.

A dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da síntese de NO, compete com a L-arginina produzindo citrulina e dimetilamina. A ADMA é formada por metilação pós-tradução, envolvendo a adição de grupos metil a resíduos de arginina por metiltransferases. A ADMA é liberada no citosol quando proteínas com resíduos de arginina são hidrolisadas, sendo assim um produto obrigatório da renovação proteica (METZGER *et al.*, 2013; TAIN; HSU, 2017). Nosso grupo de pesquisa e outros relataram níveis mais elevados de ADMA em mulheres com PE (ALPOIM; GODOI; *et al.*, 2013; NÉMETH *et al.*, 2018) e que a ADMA circulante está elevada antes do desenvolvimento de sinais clínicos de PE (YUAN *et al.*, 2017). Embora o rim desempenhe um papel importante na eliminação da ADMA, a sua conversão pela dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH 1 e 2) em citrulina e dimetilamina é a via metabólica mais importante (METZGER *et al.*, 2013).

A *DDAH2* é altamente expressa na placenta, enquanto a renovação proteica é aumentada na unidade fetoplacentária em desenvolvimento (POPE *et al.*, 2009). Estas descobertas sugerem um papel importante da *DDAH2* na regulação da função dos trofoblastos pelo seu efeito na produção de NO (AYLING *et al.*, 2006). Embora a relação entre DDAH, aumento dos níveis de ADMA e comprometimento da síntese de NO já tenha sido identificada, a regulação da expressão gênica e da atividade do DDAH permanecem desconhecidas (PALM *et al.*, 2007; POPE *et al.*, 2009). Além disso, nenhum estudo anterior investigou se polimorfismos e haplótipos do gene *DDAH2* estão associados à PE. Portanto, é possível que os haplótipos *DDAH2* ou as interações entre os polimorfismos de *DDAH2* e *NOS3* possam estar associados à PE de início precoce e tardio.

A deficiência na atividade do DDAH2 contribui para níveis elevados de ADMA, o que compromete a síntese de NO (MURRAY-RUST *et al.*, 2001). Nosso grupo encontrou níveis plasmáticos aumentados de ADMA na PE grave de início precoce em comparação com a PE grave de início tardio (ALPOIM; GODOI; *et al.*, 2013). Como as enzimas DDAH estão diretamente envolvidas no catabolismo da ADMA, seria de se esperar que os polimorfismos da *DDAH2* pudessem estar relacionados

com a ocorrência de PE. Sabe-se que aproximadamente 20% da ADMA é excretada na urina e que a disfunção renal é frequentemente observada na PE. Assim, pode-se inferir que parte da ADMA plasmática em mulheres com PE pode estar relacionada à disfunção renal. Além disso, foi demonstrado que a DDAH pode ser inativada nos túbulos renais pela proteinúria, levando ao acúmulo de ADMA (UEDA; YAMAGISHI; OKUDA, 2010). Outros fatores, como estresse oxidativo, aumento dos níveis plasmáticos de glicose e homocisteína também podem contribuir para a redução da atividade da DDAH (STÜHLINGER *et al.*, 2001). Maior estresse oxidativo em mulheres com PE (DAGLAR *et al.*, 2016) e maiores níveis de homocisteína já foram descritos em PE quando comparados a gestantes normotensas (ZENG *et al.*, 2015).

Embora nenhum estudo anterior tenha examinado os efeitos dos polimorfismos *DDAH2* nos níveis de ADMA na PE, o alelo C do polimorfismo -1151C/A foi associado aos níveis mais elevados de ADMA em indivíduos com diabetes tipo 2 (MARRA *et al.*, 2013) e em pacientes com doença renal crônica (PALM *et al.*, 2007). Além disso, descobriu-se que o alelo G e o genótipo GG no polimorfismo -449C/G estavam associados à redução da atividade de *DDAH2* (LAMB DEN *et al.*, 2018; WANG, TAO *et al.*, 2017). Por outro lado, o genótipo AA para o polimorfismo -1151C/A foi associado a um aumento na prevalência de hipertensão (MAAS *et al.*, 2009). Além disso, a presença de pelo menos um alelo A foi relacionada ao aumento dos níveis de ADMA e também ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GAD *et al.*, 2011). Em contrapartida, outro estudo não encontrou relação entre genótipos no gene *DDAH2* e níveis de ADMA e vasodilatação dependente do endotélio ou com medição de dilatação mediada por fluxo (LIND *et al.*, 2013).

Até onde sabemos, nenhum estudo anterior examinou se os haplótipos *DDAH2* estavam associados à PE de início precoce e tardio. Sabe-se que a análise de associação de haplótipos pode oferecer melhor informação genética em comparação com a análise de marcadores genéticos únicos (CRAWFORD; NICKERSON, 2005), além disso, pode capturar os efeitos combinados de variantes causais (CLARK, 2004).

2.5.2 ECA

Embora a etiopatogenia da PE ainda não esteja completamente elucidada, existe um consenso de que a placenta desempenha um papel fundamental neste contexto e que a doença é multifatorial, ou seja, causada por uma combinação de fatores genéticos, imunológicos e ambientais (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2014). Como diferentes genes estão associados ao início e à progressão da PE, vários estudos avaliaram a relação entre diferentes polimorfismos e mecanismos patogênicos da doença. No entanto, a predisposição genética para PE e suas complicações permanecem como incógnitas (VALENZUELA *et al.*, 2012).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) desempenha um papel fundamental na regulação da pressão arterial através de uma série de reações enzimáticas. O angiotensinogênio (Agt) é convertido em angiotensina (Ang) 1 pela catálise da renina, e a enzima conversora de angiotensina (ECA) medeia a conversão de Ang 1 em Ang 2 (HALL, 1991). O SRAA, a nível sistêmico e intrarrenal, é ativado durante a gravidez normal para controlar o equilíbrio hidroeletrólítico e, conseqüentemente, a pressão arterial materna, a fim de manter uma perfusão placentária adequada para o bem-estar da mãe e do feto (LUMBERS; PRINGLE, 2014). Evidências sugerem que a inserção (I) ou deleção (D) de um fragmento de 287 pb no íntron 16 do gene *ECA* possa influenciar a expressão e atividade da enzima codificada (RIGAT *et al.*, 1990; SUEHIRO *et al.*, 2004).

Sabe-se que a ECA catalisa a conversão de Ang1 em Ang2, que tem potente efeito vasoconstritor, e inativa o vasodilatador bradicinina (HALL, 1991). Foi demonstrado que a expressão e atividade do mRNA da ECA são alteradas quando há inserção (I) ou deleção (D) de um fragmento de 287 pb no íntron 16 do gene da *ECA*. Nesse contexto, três genótipos foram descritos: II, ID e DD, onde os genótipos D/D ou I/I estão associados à alta e baixa atividade da ECA, respectivamente, enquanto o genótipo ID apresenta atividade intermediária (RIGAT *et al.*, 1990; SUEHIRO *et al.*, 2004). A atividade aumentada da ECA e a ligação da Ang2 aos receptores tipo 1 da angiotensina II (AT1R) têm sido associadas a doenças nas quais a lesão endotelial desempenha um papel importante (MOMBOULI, 1997). De fato, os indivíduos com genótipo DD apresentam um risco aumentado de hipertrofia ventricular esquerda, infarto do miocárdio e nefropatia (JALIL *et al.*, 2003; RIGAT *et al.*, 1990). Curiosamente, a isoforma 2 da ECA (ACE2) produz o peptídeo vasoprotetor Ang-(1-7), indicando que a homeostase vascular depende do equilíbrio

entre os níveis de ECA/Ang2 e ECA2/Ang-(1-7) (OLKOWICZ; CHLOPICKI; SMOLENSKI, 2015).

Além disso, sabe-se que o SRAA é regulado durante a gravidez normal para controlar a pressão arterial materna e o equilíbrio eletrolítico. No início da gestação, o estrogênio induz a produção de Ang2 através da regulação positiva de Agt e os níveis de Agt e Ang2 aumentam durante a gravidez. Os níveis de renina permanecem semelhantes aos níveis de não gestantes até a 20ª semana de gestação e depois aumentam até o parto. Por outro lado, a atividade da ECA permanece inalterada durante o curso normal da gravidez (LUMBERS; PRINGLE, 2014).

Com base nesses dados, alguns estudos avaliaram se o polimorfismo I/D no gene da ECA poderia estar envolvido na ocorrência de PE. No entanto, os achados são conflitantes. Dois estudos envolvendo a população brasileira não encontraram associação significativa entre o polimorfismo I/D e a ocorrência de PE (GALÃO *et al.*, 2004; VELLOSO *et al.*, 2007). Da mesma forma, estudos realizados em outros grupos étnicos, como sul-africanos, caucasianos e chineses, não relataram associação (LI, HUA *et al.*, 2007; MORGAN *et al.*, 1999; ROBERTS, CANDICE B *et al.*, 2004). Por outro lado, estudos envolvendo mulheres mexicanas, iranianas do sudeste, egípcias e turcas apontaram para uma relação entre a presença do alelo D e um risco aumentado para o desenvolvimento de PE (ATALAY *et al.*, 2012; GONZÁLEZ-GARRIDO *et al.*, 2017; KAMHA; ABDELMONSIF; ABDELDAIM, 2013; SALIMI *et al.*, 2011). Kamha *et al.* (2013) relataram que o genótipo DD estava significativamente associado à ocorrência de PE de início precoce em mulheres egípcias (KAMHA; ABDELMONSIF; ABDELDAIM, 2013). Notavelmente, a proteinúria grave e a disfunção renal foram mais comuns em mulheres chinesas com PE portadoras do alelo D (LI *et al.*, 2007). Além disso, Mello *et al.* (2003) demonstraram que mulheres italianas com genótipo DD que desenvolveram PE apresentaram valores mais elevados de índice de pulsatilidade da artéria umbilical na 16ª, 20ª e 24ª semanas em comparação com aquelas portadoras dos genótipos ID e II (MELLO *et al.*, 2003).

2.5.3 ESR1

Os estrogênios exercem o seu papel através da ligação a uma proteína G associada à membrana (GPR30 ou GPER) ou a receptores nucleares (ESR α ou

ESR1, e ESR β ou ESR2). Quando os estrogênios ativam o GPR30, são desencadeados efeitos não genômicos rápidos, mas uma vez que se ligam aos receptores nucleares, exercem efeitos de longo prazo, regulando a transcrição de diferentes genes. Evidências sugerem que a sinalização anormal dos receptores de estrogênio desempenha um papel não apenas nos distúrbios reprodutivos, mas também nas doenças cardiovasculares e em uma série de outras doenças (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015; PATERNI *et al.*, 2013). Inclusive, polimorfismos no gene do receptor de estrogênio (*ESR1*) têm sido associados a variações da pressão arterial (PETER *et al.*, 2005). Os polimorfismos do gene *ESR1* mais frequentemente estudados estão localizados no primeiro íntron (c.454 -397T>C: sítio de restrição PvuII [rs2234693] e c.454 -351A>G: sítio de restrição XbaI [rs9340799]) (EL-BESHBISHY *et al.*, 2015; MOLVAREC *et al.*, 2007), o que pode afetar a expressão e função deste receptor nuclear (ZHANG, JUAN *et al.*, 2009).

Considerando que a hipertensão e a má perfusão placentária são características importantes na PE, polimorfismos nos genes *ACE* e *ESR1* podem estar envolvidos na predisposição e/ou desenvolvimento da doença. Estudos anteriores investigaram estes polimorfismos em mulheres com PE, mas os seus resultados são conflitantes (MEDICA; KASTRIN; PETERLIN, 2007; MOLVAREC *et al.*, 2007; SHAIK *et al.*, 2011; ZHANG, JUAN *et al.*, 2009; ZHONG *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, sabe-se que o estrogênio exerce parte de seus efeitos através da ligação ao receptor nuclear ESR1, que é expresso principalmente nos tecidos reprodutivos humanos e também em outros tecidos, incluindo o músculo liso e o endotélio vascular (PATERNI *et al.*, 2013). Além de ser ativado pelo estrogênio, esse receptor pode ser ativado por fatores de crescimento na ausência de estrogênio (MENDELSON, 2002). Como o ESR1 é amplamente expresso e pode interagir com diferentes ligantes, sua ativação está associada a diversos processos fisiológicos, bem como à reprodução feminina, função cardiovascular e coagulação/fibrinólise sanguínea (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015; ROSENDAAL, 2005). Durante a gestação, o estrogênio liga-se aos seus receptores nucleares para controlar o tônus vascular, promover a angiogênese e a remodelação dos vasos sanguíneos uterinos (PASTORE *et al.*, 2012).

Nesse contexto, polimorfismos no gene *ESR1* (SNPs e repetições em tandem) têm sido associados a distúrbios cardiovasculares, como hipertensão, doença arterial coronariana e infarto do miocárdio (LEHRER *et al.*, 1993; SCHUIT, 2004; SHEARMAN *et al.*, 2003). Como a PE é uma doença hipertensiva da gravidez e, considerando o papel do estrogênio e da *ESR1* nas adaptações cardiovasculares durante a gravidez, os polimorfismos no gene *ESR1* têm se adequados como um alvo potencial envolvido na ocorrência da PE. A relação entre os polimorfismos rs2234693/rs9340799 e o risco de PE tem sido investigada em diversas populações além da brasileira, mas os achados também são controversos.

Quatro estudos com diferentes populações (sauditas, húngaras, chinesas e austríacas) não encontraram associação significativa entre o risco de PE e a presença dos polimorfismos *ESR1* rs2234693 ou rs9340799 (EL-BESHBISHY *et al.*, 2015; MOLVAREC *et al.*, 2007; TEMPFER *et al.*, 2004; ZHANG, JUAN *et al.*, 2009). No estudo El-Beshbishy, os genótipos combinados TT/AA e TT/AG foram significativamente associados à ocorrência de PE, enquanto os pacientes portadores do genótipo CG do polimorfismo rs9340799 apresentaram baixo risco de PE (EL-BESHBISHY *et al.*, 2015). O genótipo TT/AA também foi associado a um risco aumentado de PE na Hungria, mas o genótipo TT/AG foi menos frequente em gestantes com PE do que em gestantes normotensas. Além disso, as mulheres com PE portadoras do genótipo GG do polimorfismo rs9340799 apresentaram menor risco de restrição do crescimento fetal (MOLVAREC *et al.*, 2007). Por outro lado, nenhuma combinação dos genótipos dos polimorfismos *ESR1* rs2234693 e rs9340799 foi significativamente associada ao risco de PE em mulheres chinesas. Entretanto, as gestantes normotensas portadoras dos genótipos CC e CT apresentaram pressão arterial sistólica mais elevada do que as homozigotas TT para o polimorfismo rs2234693 (ZHANG, JUAN *et al.*, 2009).

A discrepância entre esses estudos pode ser parcialmente devida à etnia. Para a população brasileira, esse fator é particularmente importante, uma vez que o povo brasileiro resulta da miscigenação de europeus, africanos e nativos americanos durante os últimos cinco séculos (PENA *et al.*, 2009). Além disso, algumas características das gestantes também podem divergir entre os estudos, como a gravidade e a idade gestacional. Além disso, como a PE é uma doença multifatorial, os fatores ambientais e os polimorfismos em genes diferentes da *ECA* e da *ESR1*

podem desempenhar um papel importante na suscetibilidade das mulheres à sua ocorrência (ZHANG, JUAN *et al.*, 2009). Além do mais, modificações epigenéticas (metilação do DNA, modificação de histonas e regulação de microRNAs) também podem contribuir para a patogênese da PE (JANUAR *et al.*, 2015). Portanto, mais estudos são necessários para avaliar a influência de múltiplas modificações genéticas e epigenéticas na PE.

2.5.4 Endocan

O endocan é um marcador bioquímico de disfunção endotelial que está potencialmente associado à resposta imunoinflamatória (BALTA *et al.*, 2015; KALI; SHETTY, 2014). Dados anteriores do nosso grupo de estudos demonstraram que a disfunção endotelial e a inflamação são características importantes na PE (ALPOIM *et al.*, 2014; ALPOIM; GODOI; *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2013).

Em um levantamento da literatura, foi possível identificar oito estudos que investigaram o endocan em mulheres com PE (ADEKOLA *et al.*, 2015; CAKMAK *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2015; CHEW *et al.*, 2019; HENTSCHKE *et al.*, 2015, 2018; SCHUITEMAKER *et al.*, 2018; YUKSEL *et al.*, 2015). Dois desses estudos não encontraram diferença significativa entre os níveis de endocan na PE e na gravidez normotensa (CHANG *et al.*, 2015; YUKSEL *et al.*, 2015). No entanto, cinco estudos revelaram níveis aumentados em mulheres com PE versus gravidez normal (ADEKOLA *et al.*, 2015; CAKMAK *et al.*, 2016; HENTSCHKE *et al.*, 2015, 2018; SCHUITEMAKER *et al.*, 2018) e dois estudos mostraram que a proteína endocan no tecido da placenta é regulada positivamente na PE (CHANG *et al.*, 2015; CHEW *et al.*, 2019), sugerindo o seu envolvimento na patogênese da PE. Vale ressaltar que, entre os estudos que encontraram uma associação positiva entre os níveis de endocan e o desenvolvimento de PE, um foi realizado no Brasil (HENTSCHKE *et al.*, 2018).

Curiosamente, Chang *et al.* (2015) relataram que, embora os níveis plasmáticos de endocan não se correlacionassem com a ocorrência de PE, foi encontrada uma expressão aumentada de mRNA e desta proteína na placenta de mulheres com PE (CHANG *et al.*, 2015). Tal achado poderia sugerir que o endocan

está relacionado com a fisiopatologia da doença, mas apenas no microambiente da placenta, não refletindo as alterações placentárias no plasma.

3 METODOLOGIA

O presente estudo avaliou marcadores genéticos e bioquímicos possivelmente associados à PE. Devido à impossibilidade de realizar a coleta de amostras biológicas de gestantes durante a pandemia de COVID-19, a avaliação dos microRNAs envolvidos na PE foi conduzida por meio de uma revisão sistemática. Os demais marcadores foram avaliados conforme descrito a seguir. As análises resultaram na publicação de artigos, que serão apresentados na seção dos resultados.

3.1 microRNA

Esta revisão sistemática seguiu as diretrizes metodológicas do Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (6) e os resultados foram apresentados de acordo com o Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (7). A etapa de busca, extração de dados e avaliação do risco de viés foram conduzidas por dois pesquisadores de forma independente, com as discordâncias resolvidas pelos pares.

O protocolo do estudo foi registrado no Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas (PROSPERO) em 18 de setembro de 2021, sob o número de identificação de registro CRD42021274280.

3.1.1 Pergunta de pesquisa

A pergunta de pesquisa foi composta por População (gestantes), Variável (ocorrência de pré-eclâmpsia), Desfecho (níveis de expressão de microRNAs) e Estudo (estudos analíticos e observacionais). Portanto, esta revisão sistemática teve como objetivo responder à seguinte questão: Quais microRNAs expressos diferencialmente (no plasma ou na placenta) estão associados à ocorrência de PE?

3.1.2 Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi realizada em junho de 2021 e atualizada em junho de 2022 e julho de 2024 em seis bases de dados: MEDLINE/PubMed, EMBASE, Web of Science, Cochrane, Scielo e Lilacs. Pré-eclâmpsia e microRNAs foram utilizados

como palavras-chave, bem como variações desses termos (a estratégia de busca completa está disponível nos arquivos suplementares). Nenhum filtro de idioma ou data de publicação foi utilizado, no entanto, artigos em chinês (N=4), russo (3) e checo (N=1) foram excluídos porque nenhum membro do grupo de pesquisa foi capaz de traduzi-los com precisão.

Como critérios de inclusão, selecionamos 1) estudos caso-controle e de coorte que determinaram a expressão de microRNA no sangue e/ou placenta em gestantes com PE de início precoce ou tardio e em gestantes normotensas durante os três trimestres gestacionais. PE foi definida como elevação da pressão arterial (PA \geq 140/90 mmHg) com pelo menos 2 horas de intervalo em repouso, após 20 semanas de gravidez, com evidência de danos a órgãos-alvo, como proteinúria e/ou sintomas clínicos (inchaço das mãos e face, dor de cabeça, distúrbios visuais, dor abdominal, náusea e vômito). Proteinúria foi definida como \geq 300 mg/24 horas e/ou leitura de tira reagente de 2+ (JAIRAJPURI *et al.*, 2017). Por outro lado, a PE de início precoce e tardio é definida pela idade gestacional de manifestação dos sintomas, antes ou depois de 34 semanas, respectivamente.

Os critérios de exclusão foram:

- 1) Texto completo indisponível (N=23);
- 2) Os critérios diagnósticos para PE não estavam claramente descritos (N=97);
- 3) A amostra biológica avaliada não era sangue ou placenta. Estudos que analisaram sangue de cordão umbilical, cultura de células ou microRNAs exossômicos também foram excluídos (N=53);
- 4) Os níveis de expressão de microRNA não foram avaliados ou não foram claramente relatados. Estudos que não relataram qual método foi utilizado para avaliar os níveis de microRNA também foram excluídos (N=78);
- 5) O grupo caso não foi composto por gestantes com PE. Não foram incluídos estudos que avaliaram mulheres com hipertensão gestacional (HG), hipertensão induzida pela gravidez (HIP), restrição de crescimento fetal (RCF), história de PE, PE sobreposta ou síndrome HELLP (N=41);
- 6) O estudo não incluiu grupo controle com gestantes normotensas (N=6);

- 7) O estudo não descreveu o número de participantes com PE e/ou normotensas (N=20);
- 8) A publicação foi retratada ou foi apenas uma retificação (N=6);
- 9) O artigo não pôde ser traduzido (N=8) porque estava em chinês (N=4), russo (3) ou checo (N=1);
- 10) O estudo foi realizado em animais (N=10);
- 11) A metodologia do estudo envolveu análise bioinformática (N=11); e
- 12) O tipo de publicação foi artigo de revisão, editorial ou comentário (N=7).

Também realizamos uma busca manual de outros estudos nas citações das publicações incluídas primariamente nesta revisão. Além disso, buscamos resumos de congressos na Embase, utilizando as mesmas palavras-chave utilizadas para busca de artigos. Para obtenção de dados incompletos dos artigos selecionados, tentou-se contato com os autores. Na ausência de resposta, procedeu-se com a exclusão do artigo.

3.1.3 Extração de dados

A seleção e extração dos dados foram realizadas por dois revisores independentes (ACSL e AAM), utilizando os softwares Rayyan (para detecção e exclusão de duplicidades, seleção de títulos e resumos) e Microsoft Excel (para extração e análise dos dados). As divergências foram resolvidas por um terceiro examinador (PNA).

Dos estudos foram extraídas as seguintes informações: autores, título, ano de publicação, país, tipo de estudo (caso-controle ou coorte), critérios de diagnóstico de PE, número de participantes, amostra biológica (sangue e/ou placenta), dados clínicos para PE e gestantes normotensas (idade materna, idade gestacional na amostragem e parto, pressão arterial sistólica e diastólica, níveis de proteinúria, contagem de plaquetas, níveis de creatinina sérica, atividade de aminotransferases séricas – AST e ATL, índice de massa corporal - IMC, resultados adversos ou complicações, peso fetal ao nascer), classificação de PE (precoce/tardia, leve/grave), microRNAs analisados, perfis de expressão de microRNA e métodos utilizados para detecção de microRNA. Além disso, dados quantitativos relativos aos níveis de expressão de microRNA foram extraídos, quando disponíveis.

Foram excluídos estudos que não apresentavam pelo menos uma das seguintes informações: autores, título, país, ano de publicação, tipo de estudo, amostra biológica, número de participantes, critérios de diagnóstico de PE, microRNAs avaliados, status de expressão de microRNA (regulado positivamente, regulado negativamente), método utilizado para quantificação de microRNA.

3.1.4 Qualidade metodológica

Para avaliar a qualidade dos estudos de caso-controle e de coorte, utilizamos a Escala de Avaliação de Qualidade Newcastle-Ottawa (NOS) para Estudos de Caso-Controle (WELLS G *et al.*, 2021). Novamente, esta etapa foi realizada por dois revisores independentes e as divergências foram resolvidas por um terceiro revisor. Esta escala inclui oito itens divididos em três componentes: 1) seleção, 2) comparabilidade e 3) exposição. Os estudos receberam uma pontuação de 0 a 9, com estudos com pontuação ≥ 8 considerados como de alta qualidade, com pontuação entre 5 e 7 considerados como de qualidade moderada e com pontuação ≤ 4 considerados como de baixa qualidade.

3.1.5 Síntese e análise de dados

As análises estratificadas foram realizadas por amostra biológica (sangue e/ou placenta) e, quando possível, por classificação da PE (PE precoce; PE tardia) e trimestre gestacional em que a amostra biológica foi obtida (primeiro, segundo e terceiro trimestres). Analisamos quais microRNAs foram expressos diferencialmente em cada grupo e tentamos correlacioná-los com seu papel biológico.

3.2 ADMA E DDAH2

3.2.1. Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (ETIC 0530.0.203.000-09). O consentimento informado foi obtido de todos os participantes. Esta pesquisa foi realizada de acordo com a Declaração de

Helsinque, revisada em 2008, sem interferência com recomendações ou prescrições médicas.

3.2.2. Desenho do estudo

Este estudo de caso-controle incluiu 208 gestantes brasileiras no terceiro trimestre de gestação distribuídas em três grupos: gestantes normotensas controles (NP, n=102), PE de início precoce (n=57) e PE de início tardio (n=49). As gestantes com PE foram selecionadas no momento da admissão hospitalar, enquanto as gestantes normotensas foram selecionadas em consulta clínica de rotina, quando foram coletadas as amostras de sangue.

2.2.3. Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para PE grave foram definidos por pressão arterial sistólica ≥ 160 mmHg ou pressão arterial diastólica ≥ 110 mmHg, em pelo menos duas ocasiões e com quatro horas de intervalo, após 20 semanas de gestação. Outros sinais e sintomas clínicos também foram considerados, incluindo distúrbios cerebrais ou visuais, insuficiência renal progressiva e comprometimento da função hepática (MOL *et al.*, 2016). As gestantes com PE grave foram agrupadas de acordo com a idade gestacional no início dos sintomas em início precoce (idade gestacional < 34 semanas) e início tardio (idade gestacional ≥ 34 semanas) (KENNY *et al.*, 2014). O grupo de gestantes normotensas incluiu mulheres saudáveis, sem histórico de PE ou hipertensão.

Os critérios de exclusão comuns para todos os grupos foram: hipertensão crônica, diabetes *mellitus*, câncer, distúrbios de coagulação, doenças cardiovasculares, autoimunes, hepáticas, renais e inflamatórias/infecciosas. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos dos prontuários e entrevistas com as participantes.

3.2.4. Determinação dos níveis de ADMA

Os níveis plasmáticos maternos de ADMA foram avaliados por ELISA (Diagnostika GmbH, Köln, Alemanha), conforme descrito na literatura (ALPOIM; GODOI; *et al.*, 2013).

3.2.5. Determinação genotípica para polimorfismos *DDAH2*

O DNA foi extraído e purificado de sangue total, previamente coletado em EDTA, utilizando Biopur Mini Spin Kit® (Biometrix, Brasil), conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas a -80°C até a análise.

O polimorfismo -1415G\A (rs2272592) foi avaliado por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) utilizando o TaqMan SNP Genotyping Assay C___3233670_1, no equipamento StepOne Real-Time PCR System (Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA). Em todas as reações de PCR, amostras de indivíduos previamente genotipados foram incluídas como controles. Além disso, 10% das amostras foram regenotipadas para confirmação dos resultados.

Os polimorfismos -1151A/C (rs805304) e -449G/C (rs805305) no gene *DDAH2* foram genotipados por reação em cadeia da polimerase seguida de análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Foram utilizados os seguintes *primers*: 5'-CCGTTGCGCTGTTCTGAGGTCTAC-3' (senso) e 5'-CGGCTCCGGGGCATTGTCTA-3' (antissenso) para o polimorfismo -1151A/C; 5'-CCTTCTCGTTCGGGGTATTCAG-3' (senso) e 5'-TCCAGACCTTCCGCTCCT-3' (antissenso) para o polimorfismo -449G/C.

O volume final da mistura de reação de PCR foi de 20 µL e continha 1 mM de cada *primer* (Invitrogen®, São Paulo, Brasil), 0,2 mM de desoxinucleosídeo trifosfato (Ludwig Biotec®, Alvorada, Brasil), 2,5 µL de tampão PCR 10X e 0,5 unidades Taq polimerase (Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA). As reações foram realizadas em termociclador PCR 2720 (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA) com etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por 40 segundos, 50 segundos a 71°C e 56°C para anelamento do *primer* dos polimorfismos -1151A/C e -449G/C, respectivamente, e extensão a 72°C por 30 segundos.

Os produtos de PCR de -1151A/C e -449G/C foram submetidos à digestão por endonuclease por 4 horas a 37°C com a enzima Mnl1 (Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA) e por 3,5 horas a 30°C com a enzima Sma1 (Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA), respectivamente, em reação única. Os fragmentos foram visualizados em eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata.

As genotipagens para os polimorfismos NOS3, T-786C (rs2070744) na região promotora, o VNTR de 27 pb no íntron 4 e Glu298Asp (G894T, rs1799983) no éxon 7 foram realizadas conforme descrito anteriormente na literatura (SIROEN *et al.*, 2006).

3.2.6. Estimativas de haplótipos

As frequências de haplótipos foram estimadas usando o pacote Haplo.stats versão 1.4.4 (<http://cran.r-project.org/web/packages/haplo.stats/index.html>), que calcula estimativas de máxima verossimilhança de haplótipos e diferenças nas frequências de haplótipos usando pontuações específicas de haplótipos para testar a associação (MURRAY-RUST *et al.*, 2001). Os possíveis haplótipos incluindo os alelos para os polimorfismos *DDAH2* -1415G/A (rs2272592), -1151A/C (rs805304) e -449G/C (rs805305) foram: G-C-C, G-A-G, A-A-G, G-C-G e G-A-C. A razão de chances e os intervalos de confiança de 95% foram calculados para cada haplótipo. Apenas os haplótipos com frequências >5% foram levados em consideração na análise. Um valor de $P = 0,01$ ($0,05/5$, o número de haplótipos) foi considerado significativo para corrigir o número de comparações feitas (correção de Bonferroni). Efeitos não aditivos foram selecionados para pontuar haplótipos, e também foram considerados modelos dominantes e recessivos.

3.2.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com software SPSS (SPSS: An IBM Company, versão 17.0, Nova York, EUA) e STAT pages. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Variáveis não paramétricas (idade, idade gestacional, índice de massa corporal, ganho de peso, pressão arterial sistólica e

diastólica) foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis categóricas (polimorfismos -1415 G/A, -449 C/G e -1151 C/A) foram comparadas entre os grupos pelo teste Qui-Quadrado de Pearson. A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo foi avaliada quanto ao desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e as diferenças nas frequências genóticas e alélicas entre os grupos foram avaliadas por meio de testes χ^2 . Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.3 POLIMORFISMOS ACE E ESR1

3.3.1 Amostra do estudo

Este estudo caso-controle incluiu 209 gestantes brasileiras (107 com PE grave e 102 controles normotensos) selecionadas na Maternidade Odete Valadares (Belo Horizonte) e no Hospital Público Regional de Betim (Betim/Brasil), entre 2008 e 2011. Todas as mulheres forneceram consentimento informado por escrito e as aprovações éticas foram obtidas da Universidade Federal de Minas Gerais (0530.0.203.000-09) e das instituições de saúde pública envolvidas. Os dados clínicos foram obtidos de prontuários médicos e entrevista durante o recrutamento.

A forma grave de PE foi definida por pressão arterial sistólica ≥ 160 mmHg, ou pressão arterial diastólica ≥ 110 mmHg em duas ocasiões com pelo menos 4 horas de intervalo, e se algum destes achados estivesse presente: proteinúria; trombocitopenia; função hepática prejudicada; insuficiência renal progressiva; edema pulmonar; distúrbios cerebrais ou visuais de início recente (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2013). Mulheres com PE grave foram estratificadas como PE precoce (N=57) ou PE tardia (N=50) de acordo com o momento de início dos sintomas clínicos (DEKKER *et al.*, 1995). Gestantes normotensas apresentavam pressão arterial sistólica/diastólica $\leq 120/80$ mmHg e sem história de hipertensão e proteinúria. Os critérios de exclusão comuns aos dois grupos foram: hipertensão prévia, alterações hemostáticas, câncer, gestação gemelar, diabetes, doenças cardiovasculares, autoimunes, renais e hepáticas.

3.3.2 Coleta e processamento das amostras de sangue

O DNA genômico foi extraído da amostra de sangue periférico total utilizando Biopur Mini Spin Kit® (Biometrix, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.3 Análise do polimorfismo do gene *ECA*

O polimorfismo I/D da *ECA* foi investigado por reação em cadeia da polimerase (PCR). O iniciador *forward* 5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT-3' e o iniciador *reverse* 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3' foram utilizados para amplificar os alelos D e I, resultando em amplicons de 319 pb e 597 pb, respectivamente. Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida e posterior coloração com prata.

3.3.4 Análises de polimorfismos *ESR1*

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *ESR1* foram avaliados por PCR-RFLP utilizando as enzimas de restrição PvuII para o polimorfismo rs2234693 e XbaI para o polimorfismo rs9340799.

Para o polimorfismo rs2234693, foram utilizados os seguintes *primers*: 5'-CAGGGTTATGTGGCAATGAC-3' (*forward*) e 5'-TACCTATAAAAATGACAAAATGAAT-3' (*reverse*). No gel de eletroforese de poliacrilamida, após o tratamento com enzimas de restrição, o genótipo TT foi visualizado como um único fragmento de 255 pb; o genótipo TC como três fragmentos de 97bp, 158bp e 255bp; e o genótipo CC foi visualizado como dois fragmentos de 97 pb e 158 pb.

O polimorfismo rs9340799 foi investigado com o *primer forward* 5'-CAGGGTTATGTGGCAATGAC-3', e o *reverse* 5'-TACCTATAAAAATGACAAAATGAAAT-3'. No gel de eletroforese de poliacrilamida, o genótipo AA foi visualizado como dois fragmentos de 113 pb e 142 pb; o genótipo AG como três fragmentos de 113 pb, 142 pb e 255 pb; e o genótipo GG foi visualizado como um fragmento de 255 pb após tratamento enzimático.

3.3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Genepop on the Web ([//genepop.curtin.edu.au/](http://genepop.curtin.edu.au/)) e o *software* SPSS versão 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As características clínicas (variáveis não paramétricas) foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo foi avaliada quanto ao desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e as diferenças nas frequências genóticas e alélicas entre os grupos PE e normotensos foram avaliadas pelo teste qui-quadrado de Pearson. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.4 ENDOCAN

Este estudo caso-controle incluiu 80 gestantes brasileiras, 40 com PE grave (pressão sistólica >160 mmHg ou pressão diastólica >110 mmHg) e 40 gestantes normotensas (controles). Os níveis de Endocan foram investigados por ensaio imunoenzimático (Lunginnov[®] ELISA kit Endocan JDIEK H1), seguindo as instruções do fabricante. A análise estatística foi realizada no SPSS 19.0. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças nos níveis de endocan entre os grupos PE e normotensos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

O presente trabalho resultou na redação de quatro artigos, sendo três deles já publicados e um aceito para publicação após revisão, conforme exposto a seguir.

ARTIGO 1 - Changes in microRNA expression associated with preeclampsia: a systematic review

LOPES, Ana Cristina; MACEDO, Alexandre; MENDES, Fernanda; COSTA, Isabella; DUSSE, Luci; ALPOIM, Patrícia. Changes in microRNA expression associated with preeclampsia: a systematic review.

Artigo submetido ao Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Qualis A3) e aceito para publicação após ser revisado.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research



CHANGES IN MICRORNA EXPRESSION ASSOCIATED WITH PREECLAMPSIA: A Systematic Review

Journal:	<i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>
Manuscript ID:	13988
Manuscript Type:	Systematic Review
Date Submitted by the Author:	13-Mar-2024
Complete List of Authors:	Lopes, Ana Cristina; Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis - Faculty of Pharmacy Macedo, Alexandre; Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis - Faculty of Pharmacy Mendes, Fernanda; Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis - Faculty of Pharmacy Costa, Isabella; UFMG, Department of Clinical and Toxicological Analysis - Faculty of Pharmacy Dusse, Lud ; Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis - Faculty of Pharmacy Alpoim, Patricia; UFMG, Department of Clinical and Toxicological Analysis - Faculty of Pharmacy
Keywords:	Preeclampsia, microRNAs, biomarkers, systematic review, Expression
Special Sections:	Biomedical Sciences/Biochemistry and Molecular Biology

SCHOLARONE™
Manuscripts



**CHANGES IN MICRORNA EXPRESSION ASSOCIATED WITH
PREECLAMPSIA: A Systematic Review**

Journal:	<i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>
Manuscript ID	13988.R1
Manuscript Type:	Systematic Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lopes, Ana Cristina; Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis – Faculty of Pharmacy Macedo, Alexandre; Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis – Faculty of Pharmacy Mendes, Fernanda; Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis – Faculty of Pharmacy Costa, Isabella; UFMG, Department of Clinical and Toxicological Analysis – Faculty of Pharmacy Dusse, Luci ; Federal University of Minas Gerais, Department of Clinical and Toxicological Analysis – Faculty of Pharmacy Alpoim, Patricia; UFMG, Department of Clinical and Toxicological Analysis – Faculty of Pharmacy
Keywords:	Preeclampsia, microRNAs, biomarkers, systematic review, Expression
Special Sections:	Biomedical Sciences/Biochemistry and Molecular Biology

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjmbbr-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CHANGES IN MICRORNA EXPRESSION ASSOCIATED WITH PREECLAMPSIA: A SYSTEMATIC REVIEW

MicroRNA and preeclampsia: systematic review

Ana Cristina dos Santos Lopes^a; <https://orcid.org/0000-0002-1111-7509>

Alexandre Afonso de Macedo^a; <https://orcid.org/0009-0006-5750-8114>

Fernanda Santos Mendes^a; <https://orcid.org/0000-0001-7717-7398>

Isabella Macedo Costa^a; <https://orcid.org/0000-0002-9919-1358>

Luci Maria SantAna Dusse^a; <https://orcid.org/0000-0002-7484-1684>

Patrícia Nessler Alpoim^{a*} <https://orcid.org/0000-0002-3602-2645>

^aDepartament of Clinical and Toxicological Analysis – Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

*Corresponding author: Patrícia Nessler Alpoim (patnessralla@yahoo.com.br)

Address: Faculty of Pharmacy, *Federal University of Minas Gerais*.

St. Professor Moacir Gomes de Freitas, room 4156 – B3, Pampulha, Belo Horizonte – Minas Gerais (MG), Brazil.

ZIP CODE: 31270901

Phone: +553134097492

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a pregnancy specific disease characterized by the new onset of hypertension accompanied by proteinuria and/or other signs of maternal organ dysfunction, which manifests after 20 weeks of gestation. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs (19–25 nucleotides) that function in the post-transcriptional regulation of gene expression. Many studies have suggested that different microRNA expression profiles may be associated with the development of PE. Hence, this study aims to report differentially expressed microRNAs that may be associated with the pathogenesis of PE and whether different microRNA expression profiles may be associated with different PE classifications, as well as different phases of pregnancy. The bibliographic research was conducted from September 2021 to August 2024 and was performed on MEDLINE/PubMed, EMBASE and Web of Science. This systematic review followed the methodological guidelines of the Cochrane Collaboration Manual for Systematic Intervention Reviews and was written according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). Of the 1362 studies identified, 265 articles were selected to compose the sample of this study. The most frequently cited upregulated microRNAs were: miR-210, miR-155, miR-518b, miR-181a, miR-125b, miR-183 and miR-16. The most frequently cited downregulated microRNAs were: miR-363, miR-18a, miR-144, miR-149, miR-16, miR-18b and miR-195. This study will serve as a reference to guide future experimental research. In addition, knowledge of the expression profiles of microRNAs associated with PE can help in the development of new protocols for early prediction of the disease.

Keywords: Preeclampsia; microRNAs; biomarkers; systematic review.

1 INTRODUCTION

Preeclampsia (PE) is the main cause of maternal and perinatal morbidity and mortality (1). It is characterized by the new onset of hypertension accompanied or not by proteinuria and/or signs of maternal organ dysfunction, which manifests after 20 weeks of gestation (2). PE results from abnormal placentation, causing insufficient uteroplacental blood perfusion and ischemia (2). PE can be classified according to the time of disease onset as early- or late-onset PE (EOPE/LOPE), when occurring before or on/after 34 weeks of gestation, respectively (3).

MicroRNAs (miRNAs or miRs) are small non-coding RNAs (19–25 nucleotides) that function in the post-transcriptional regulation of gene expression. Many studies have suggested that different microRNA expression profiles may be associated with the development of PE (1–4). MicroRNAs play key roles in regulating diverse biological processes and have aroused great interest in the diagnosis and monitoring of various diseases (2). Several studies have suggested that these molecules may participate in the pathogenesis of PE, by regulating common pathways such as hypoxia, ischemia, angiogenesis and metabolism (3). In addition, due to their stability in plasma, the evaluation of miRNAs may be useful in the early detection of PE (2).

Although PE has been extensively studied, no laboratory marker with a favorable cost-effectiveness ratio has been proposed for signaling PE increased risk in the presymptomatic stage, which could improve the management of pregnant women, help to prevent other associated complications, and accurately monitor PE and pregnancy progress. In this context, previous studies have been carried out aiming to understanding the microRNAs expression in preeclamptic women (4,5). It's important to emphasize that previous systematic reviews have been carried out within the same topic (4). However, it's relevant to update the data, since many experimental studies have been published in the last few years, considering molecular biology development, what can lead to new data interpretations.

Noteworthy, to the best of our knowledge, no systematic review has been conducted to date to assess microRNAs expression patterns in different PE classifications (EOPE, LOPE) or in different gestational trimesters, which is a novel proposal of the present study. Hence, this systematic review aims to describe differentially expressed microRNAs – in plasma and/or placenta – that may be up or downregulated in PE and to identify possible microRNA expression profiles in different PE classifications, as well as in different pregnancy trimesters.

2 METHODS

This systematic review followed the methodological guidelines of the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (6) and the results were presented according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (7). The search stage, data extraction and assessment of the risk of bias were conducted by two researchers independently, with disagreements resolved by peers.

Study protocol was registered on International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) on September 18th, 2021, under the registration identification number CRD42021274280.

2.1 Search question

The search question was composed by Population (pregnant women), Variable (preeclampsia occurrence), Outcome (microRNAs expression levels), and Study (analytical and observational studies). Therefore, this systematic review aimed to answer the following question: Which differentially expressed microRNAs (in plasma or placenta) are associated with PE occurrence?

2.2 Bibliographic search

The bibliographic research was performed in June 2021 and updated in June 2022 and July 2024 on six databases: MEDLINE/PubMed, EMBASE, Web of Science, Cochrane, Scielo and Lilacs. Preeclampsia and microRNAs were used as keywords, as well as variations of these terms (complete search strategy is available in the supplemental files). No language or publication date filter was used, however, articles in Chinese (N=4), Russian (3) and Czech (N=1) were excluded because no member of the research group was able to accurately translate them.

As inclusion criteria, we selected 1) case-control and cohort studies that determined microRNA expression in blood and/or placenta in pregnant women with early or late-onset PE and in normotensive pregnant women during the three gestational trimesters. PE was defined as new onset elevation of blood pressure (BP \geq 140/90 mmHg at least 2 hours apart at rest, after 20 weeks of pregnancy with evidence of end organ damage such as proteinuria and/or clinical symptoms (swelling of the hands and face, headache, visual disturbances, abdominal pain, nausea, and vomiting). Proteinuria was defined as \geq 300 mg/24 hours, and/or a dipstick reading of 2+. By contrast, the early and late-onset PE are recognized by the gestational age of manifestation of the symptoms, as before or after 34 weeks, respectively.

The exclusion criteria were: 1) Full text unavailable (N=23); 2) The diagnostic criteria for PE weren't clearly described (N=97); 3) The biological sample evaluated was other than blood or placenta. Studies that analyzed umbilical cord blood, culture cells, or exosomal microRNAs were also excluded (N=53); 4) MicroRNA expression levels were not assessed or not clearly reported. Studies that did not report which method was used to assess microRNA levels were also excluded (N=78); 5) The case group did not consist of preeclamptic pregnant women. Studies evaluating women with gestational hypertension (GH), pregnancy-induced hypertension (PIH), fetal growth restriction (FGR), history of PE, superimposed PE or HELLP syndrome were not included (N=41); 6) The study did not include a control group with normotensive pregnant women (N=6); 7) The study did not describe the number of preeclamptic and/or normotensive participants (N=20); 8) The publication was retracted or was just a corrigendum (N=6); 9) The article could not be translated (N=8) because it was in Chinese (N=4), Russian (3) or Czech (N=1); 10) The study was carried out on animals (N=10); 11) The study methodology involved bioinformatics analysis (N=11); and 12) The publication type was a review article, editorial or commentary (N=7).

We also performed a manual search for other studies in the citations of publications primarily included in this review. In addition, we searched for congress abstracts on Embase, using the same keywords employed to search for articles. For obtaining incomplete data on selected articles, contact with the authors was attempted. When unsuccessful, the study was excluded.

2.3 Data extraction

Selection and data extraction were carried out by two independent reviewers (ACSL and AAM), using the software Rayyan (for duplication detection and exclusion, title and abstract selection) and Microsoft Excel (for data extraction and analysis). Disagreements were resolved by a third examiner (PNA).

The following information were extracted from the studies: authors, title, publication year, country, type of study (case-control or cohort), PE diagnosis criteria, number of participants, biological sample (blood and/or placenta), clinical data for PE and normotensive pregnant women (maternal age, gestational age at sampling and delivery, systolic and diastolic blood pressure, proteinuria levels, platelets count, serum creatinine levels, serum aminotransferases activity – AST and ALT, body mass index - BMI, adverse outcomes or complications, fetal birth weight), PE classification (early/late, mild/severe), analyzed microRNAs, microRNA expression profiles and methods used for microRNA detection. In addition, quantitative data regarding microRNA expression levels were extracted when available.

Studies that did not present at least one of the following information were excluded: authors, title, country, year of publication, type of study, biological sample, number of participants, PE diagnosis criteria, evaluated microRNAs, microRNA expression status (upregulated, downregulated), method used for microRNA quantification.

2.4 Methodological quality

To assess the quality of case-control and cohort studies we used the Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale (NOS) for Case Control Studies (8). Again, this step was performed by two independent reviewers and disagreements were resolved by a third reviewer. This scale includes eight items divided into three components: 1) selection, 2) comparability, and 3) exposure. Studies were assigned a score from 0 to 9, with studies scoring ≥ 8 as high quality, 5 to 7 as moderate, and ≤ 4 as low quality.

2.5 Data synthesis and analysis

Stratified analyzes were performed by biological sample (blood and/or placenta), and, when possible, by PE classification (early PE; late PE) and gestational trimester in which the biological sample was obtained (first, second and third trimesters). We analyzed which microRNAs were differentially expressed in each group and tried to correlate them with their biological role.

3 RESULTS

3.1 Bibliographic search

The articles found on each database (PubMed, Embase, Web of Science and LILACS) were imported into the online platform of Rayyan (9), which was used for the selection of eligible studies based on their titles and abstracts. Studies that were not excluded in this first stage were read in full, and data extraction was performed for the included articles in a Microsoft Excel spreadsheet. The article selection was carried out until June 2021. However, two updates were performed (in June 2022 and July 2024). Finally, 265 studies were selected to compose the sample of this systematic review. All the selection process and the reasons for article exclusion are described in a flowchart (Figure 1). It is important to note that several articles met more than one exclusion criterion.

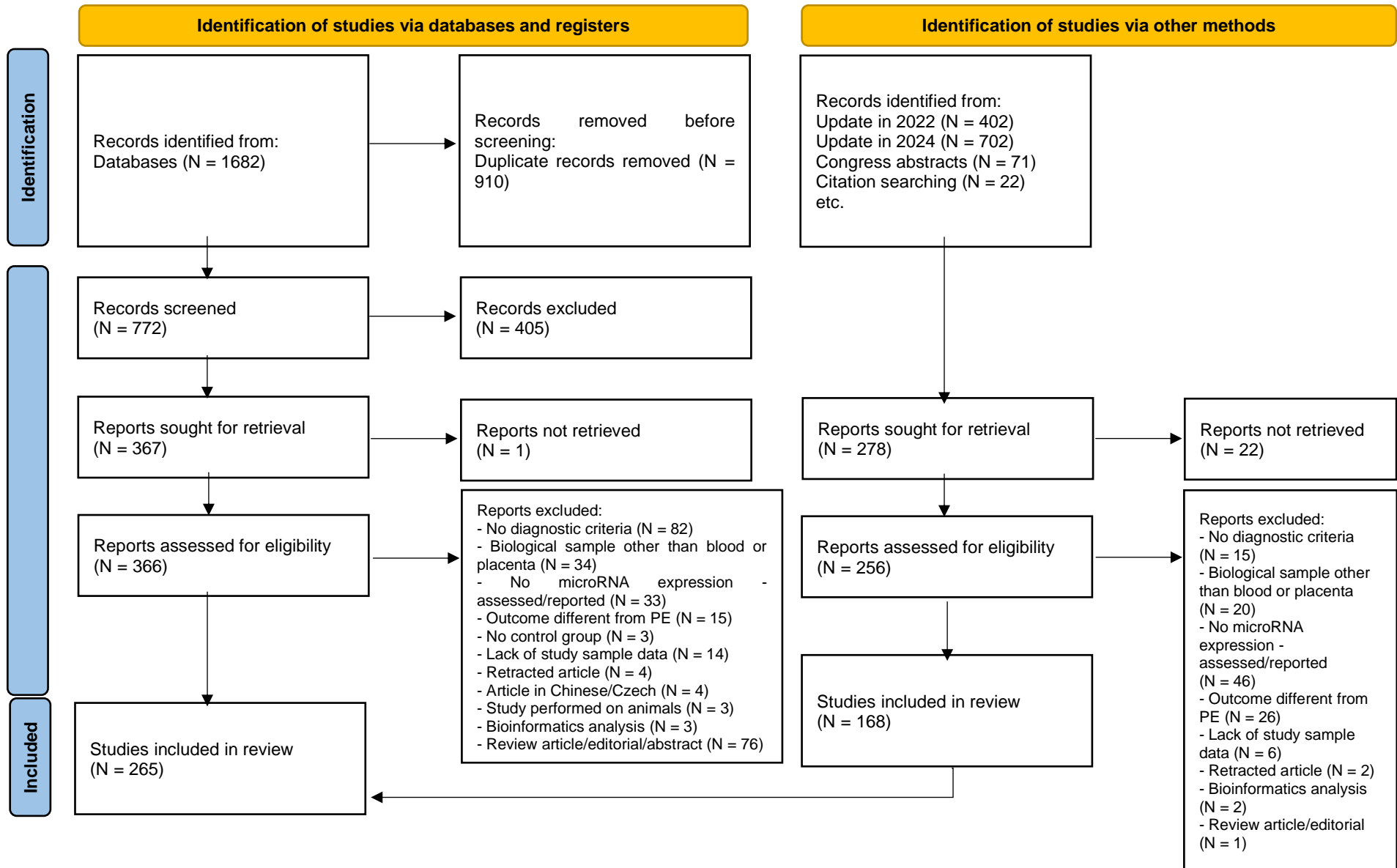


Figure 1. PRISMA 2020 flow diagram for new systematic reviews which included searches of databases, registers and other sources

From: Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71. For more information, visit: <http://www.prisma-statement.org/>

3.2 Data analysis

Data analysis can be performed considering all studies together or separating them into subgroups. For this reason, the results will be presented in separate topics in order to analyze the findings in a stratified manner.

3.2.1 General analysis

Most of the studies included in this systematic review were published in China (N=164), followed by the USA (N=13) and Turkey (N=9). The list of the number of articles published in each country is available in the supplemental files.

The year of publication of the studies ranged from 2007 to 2024 (July 2024). It was possible to observe that there was an increase in the publication of articles on the topic during this period.

Different diagnosis criteria were used for deciding on the inclusion of PE women in the studies. The most cited criteria were based on the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) Guidelines (N=80), the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP) (N=24), and Williams Obstetrics (23rd edition) (N=8). Additionally, a great number of publications described the criteria without citing any organization. Among those, the majority of studies used the following criteria: “hypertension and proteinuria after the 20th week of pregnancy” (N=70). Some studies considered only “hypertension and proteinuria” without defining a gestational age (N=45), and others also considered “organ system dysfunction or fetus growth restriction” accompanied or not by proteinuria (N=20). In disagreement with current guidelines for the diagnosis of PE, some studies considered pregnant women who manifested only hypertension or proteinuria (N=9) or developed the symptoms after the 28th (N=1) or 34th week of gestation (N=1). Additional criteria used were: the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Guidelines of 2005, 8th edition Obstetrics and Gynecology - 2006, 9th edition of Obstetrics and Gynecology, ISSHP 2018 and ACOG 2020, ISSHP and ACOG 2002, Society of Obstetrics and Gynecology of the Chinese Medical Association 2020 Guideline for Diagnosis and Treatment of Hypertensive Disorders in Pregnancy, and Diagnosis Guidelines of the Expert Committee of Severe Preeclampsia.

Among the studies included in this systematic review, 222 are case-control studies, 26 are cohort studies, and 17 are a mixture of both types of methodological design.

Regarding the biological samples analyzed, 72 studies evaluated microRNA expression levels in blood samples only, 167 studies evaluated microRNA expression in placental samples only, and 26 studies analyzed both types of biological samples for microRNA expression.

The number of participants in each study ranged from 3 to 224 for preeclamptic women and from 3 to 421 for normotensive pregnant women.

The most cited outcome or complication associated with PE was fetal birth weight (N=146), followed by placental weight (N=18), caesarean (N=17), mode of delivery (N=18), fetal growth restriction (intrauterine growth restriction/IUGR (N=12) and small for gestational age/SGA (N=4)), APGAR (1 and 5 minutes) (N=12), neonatal size (in centimeters) (N=5), induction of labor (N=2), still births or neonatal deaths (N=2), perinatal mortality (N=1), live births (N=1), miscarriage (N=1), placental conditions (decidual vasculopathy (N=1), infarct (N=1), placenta abruption (N=1), villous abnormal development (N=1)), preterm delivery (N=2), anesthesia (N=1), fetal distress (N=1), maternal weight gain (N=1), signs of HELLP (N=2), fetal sex (N=2), and anemia (N=1). Generally, 151 studies cited at least one outcome, while 114 studies cited none.

A total of 60 studies classified preeclamptic women according to the gestational age of onset of PE symptoms. Of these, 20 included only EOPE pregnant women, 9 included only LOPE pregnant women, and 31 included both EOPE and LOPE pregnant women. Additionally, 205 studies did not mention the classification of preeclamptic women according to gestational age.

Most studies (N=254) used the real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) methodology for detection and quantification of microRNAs. The second most used technique was the microarray (N=29), and several studies used both techniques (RT-qPCR and microarray) (N=28). Other methodologies employed were variations on sequencing techniques (N=9), PCR methods other than RT-qPCR (N=5), in situ hybridization (N=4), chromogenic in situ hybridization (CISH) (N=1) and enzyme-linked immunosorbent assay (N=1).

A total of 312 microRNAs were found to be upregulated. The most frequently cited upregulated microRNAs were: miR-210 (N=32) (2,10–40), miR-155 (N=16) (2,3,10,14,17,30,41–50), miR-518b (N=9) (23,24,38,51–56), miR-181a (N=9) (21,24,37,38,57–61), miR-125b (N=6) (62–67), miR-183 (N=5) (20,30,68–70) and miR-16 (N=5) (21,59,71–73). Conversely, 249 microRNAs were detected as downregulated. The most frequently cited downregulated microRNAs were: miR-363 (N=4) (21,24,38,74), miR-18a (N=5) (2,24,38,74,75), miR-144 (N=6) (2,23,38,58,76,77), miR-149 (N=3) (74,78,79), miR-16 (N=3) (58,74,80), miR-18b (N=4) (21,38,81,82) and miR-195 (N=6) (24,38,83–86). Surprisingly, miR-210, which is the most cited

upregulated microRNA in PE, was also cited as downregulated in one study (87). The full list of upregulated and downregulated microRNAs is available in the supplemental files.

3.2.2 Placental tissues

Placental microRNA expression levels were investigated in 193 studies (72,83%). Among these, 26 also assessed circulating levels. A total of 186 microRNAs were found to be upregulated in PE placenta samples, the most frequently cited being: miR-210 (N=21) (13,15,16,18,19,21,22,24–26,28–30,32–39), miR-155 (N=10) (3,30,41–46,48,50), miR-181a (N=7) (21,24,37,38,57,59,60), miR-182* (N=4) (25,30,37,88), miR-183 (N=4) (30,68–70), miR-16 (N=4) (21,59,71,73), miR-20b (N=5) (21,59,89–91) and miR-20a (N=4) (21,26,90,91). A total of 173 microRNAs were detected as downregulated in PE placenta samples, the most frequently cited being: miR-363 (N=4) (21,24,38,74), miR-18b (N=4) (21,38,81,82) and miR-195 (N=5) (24,38,83,84,86). The full list of upregulated and downregulated placental microRNAs is available in the supplemental files.

3.2.3 Blood samples

Blood microRNA expression levels were investigated in a total of 98 studies (36,98%). Among these, 26 also assessed placental levels. A total of 163 microRNAs were found to be upregulated in PE blood samples, the most frequently cited being: miR-210 (N=12) (2,10–12,14,17,20,23,24,27,31,40,49), miR-155 (N=7) (2,10,14,17,41,45,47), miR-518b (N=7) (23,24,51–56) and miR-27b-3p (N=4) (92–95). A total of 83 microRNAs were detected as downregulated in PE blood samples, the most frequently cited being: miR-16 (N=3) (58,74,80), miR-18a (N=3) (2,24,74), miR-144 (N=3) (2,23,58,77) and miR-363 (N=2) (24,74). The full list of upregulated and downregulated circulating microRNAs is available in the supplemental files.

3.2.4 Early-onset preeclampsia (EOPE)

Fifty-one studies (19,25%) assessed microRNA expression levels in early-onset PE. Among these, 31 also investigated microRNA expression profiles in late-onset PE. A total of 38 microRNAs were found to be upregulated in EOPE, the most frequently cited being: miR-518b (N=4) (51,52,54–56), miR-125b (N=3) (62,65,66) and miR-155 (N=3) (17,42,48). A total of 33 microRNAs were detected as downregulated in EOPE, the most frequently cited being: miR-16 (N=2) (74,80). The full list of upregulated and downregulated microRNAs in EOPE is available in the supplemental files.

In studies that analyzed placental samples from EOPE pregnant women, 22 microRNAs were found to be upregulated (3,42,60,96–106), while 15 were found to be downregulated (3,22,42,60,74,98,105,107–109). Except for miR-22 (cited by two different studies as upregulated (101,106)) none of the other microRNAs were cited by more than one study (Table 1).

Table 1 Differentially expressed microRNAs in EOPE placentas

Differentially expressed microRNAs in EOPE placentas	
Upregulated	Downregulated
miR-22 (101,106)	miR-135a (109)
miR-22-3p (106)	miR-140-5p (108)
miR-33b-3p (99)	miR-148b* (98)
miR-124* (3)	miR-149 (74)
miR-126 (97)	miR-149-5p (105)
miR-130b (3)	miR-181a (60)
miR-133b (103)	miR-223-3p (22)
miR-137 (102)	miR-224-5p (22)
miR-155 (3,42,48)	miR-363 (74)
miR-181a-2-3p (99)	miR-520a-3p (107)
miR-210-5p (99)	miR-544 (3)
miR-331-5p (105)	miR-937 (98)
miR-367* (98)	miR-1301 (22)
miR-372-3p (104)	miR-3907 (98)
miR-383 (3)	miR-3942 (3)
miR-423-3p (3)	
miR-431 (3)	
miR-452 (96)	
miR-518a-5p (3)	
miR-519a (60)	

 miR-663 (100)

 miR-4743-5p (105)

miR-22 was found to be upregulated by two studies.

In studies that analyzed blood samples from EOPE pregnant women, 15 microRNAs were found to be upregulated (17,51,52,54,62,66,80,110–114), while 14 were found to be downregulated (17,66,74,80,85,105,115). Except for miR-518b (cited by two different studies as upregulated (51,52)), miR-16 (74,80), and miR-195 (N=2) (cited by two different studies as downregulated (24,85)), none of the other microRNAs were cited by more than one study (Table 2).

Table 2 Differentially expressed circulating microRNAs in EOPE

Differentially expressed circulating microRNAs in EOPE	
Upregulated	Downregulated
miR-22 (112)	miR-16 (74,80)
miR-22-3p (112)	miR-18a (74)
miR-29b (114)	miR-31 (115)
miR-125b (65)	miR-125a-5p (17)
miR-126 (113)	miR-126# (66)
miR-143 (66)	miR-127 (66)
miR-155 (17)	miR-149 (74)
miR-192 (66)	miR-195 (24,85)
miR-200c (80)	miR-221 (66)
miR-210 (17)	miR-331-5p (105)
miR-320a (110)	miR-363 (74)
miR-518b (54,55)	miR-372-3p (104)
miR-574-5p (111)	miR-942 (116)
miR-1972 (111)	miR-4743-5p (105)

miR-4793-3p (111)

miR-518b was found to be upregulated by two studies.

miR-16 and miR-195 were found to be downregulated by two studies.

3.2.5 Late-onset preeclampsia (LOPE)

Forty studies (15,09%) assessed microRNA expression levels in LOPE. Among these, 31 also investigated microRNA expression profiles in EOPE. A total of 56 microRNAs were found to be upregulated in LOPE (3,22,36,45,52,54,58–60,67,100,102,104,105,117–119), the most frequently cited being: miR-181a (N=3) (58–60), miR-210 (N=2) (22,36) and miR-1183 (N=2) (3,117). A total of 26 microRNAs were detected as downregulated (42,55,58,59,67,83,92,105,115,119,120), and none of them was cited by more than one study. The full list of upregulated and downregulated microRNAs in LOPE is available in the supplemental files.

In studies that analyzed placental samples from LOPE pregnant women, 29 microRNAs were found to be upregulated (3,22,36,45,59,60,100,102,104,105,117–119), while 21 were found to be downregulated (42,48,59,67,83,92,105,119). Except for miR-181a (59,60), miR-210 (22,36) and miR-1183 (3,117) which were cited by two different studies as upregulated and miR-146a (42,48), miR-155 (42,48) which were cited by two different studies as downregulated, none of the other microRNAs were cited by more than one study (Table 3).

Table 3 Differentially expressed microRNAs in LOPE placentas

Differentially expressed microRNAs in LOPE placentas		
Upregulated		Downregulated
let-7b* (117)	miR-378c (100)	let-7c-5p (119)
let-7f-1* (117)	miR-383 (3)	miR-1 (28)
miR-16 (59)	miR-425* (117)	miR-27b-3p (92)
miR-23c (117)	miR-513c-5p (118)	miR-125b (67)
miR-26b (59)	miR-514b-3p (100)	miR-127-3p (119)
miR-29b (59)	miR-519b-3p (59)	miR-146a (42,48)
miR-126-3p (118)	miR-892c-3p (100)	miR-149-5p (105)

miR-137 (102)	miR-1183 (3,117)	miR-155 (42,48)
miR-145-5p (118)	miR-4743-5p (105)	miR-186-5p (92)
miR-155 (45)		miR-195 (83)
miR-181a (59,60)		miR-214 (59)
miR-193b-5p (118)		miR-423-5p (59)
miR-195 (59)		miR-491-5p (59)
miR-210 (22,36)		miR-508-5p (59)
miR-222 (59)		miR-519a-3p (119)
miR-296-5p (118)		miR-532-3p (59)
miR-331-5p (105)		miR-532-5p (119)
miR-335 (59)		miR-539-5p (119)
miR-371a-5p (118)		miR-612 (59)
miR-372-3p (104)		miR-629-5p (119)
		miR-658 (59)

miR-181a, miR-210 and miR-1183 were found to be upregulated by two studies. miR-146a and miR-155 were found to be downregulated by two studies.

In studies that analyzed blood samples from LOPE pregnant women, 14 microRNAs were found to be upregulated (52,54,58), while 5 were found to be downregulated (58,115,120) (Table 4). None of these microRNAs was cited by more than one study.

Table 4 Differentially expressed circulating microRNAs in LOPE

Differentially expressed circulating microRNAs in LOPE		
Upregulated	Downregulated	
miR-24 (58)	miR-151-3p (58)	miR-16 (58)
miR-26a (58)	miR-181a (58)	miR-21 (115)
miR-30d (58)	miR-221 (58)	miR-23b-5p (120)
miR-103 (58)	miR-342-3p (58)	miR-99b-5p (120)

miR-130a (58)	miR-425 (58)	miR-144 (58)
miR-130b (58)	miR-518b (52)	
miR-145 (58)	miR-574-5p (58)	

3.2.6 First trimester

Twelve studies (4,53%) assessed microRNA expression levels in the first trimester of pregnancy (from 1 to 13 weeks). Among these studies, 11 investigated microRNA levels in blood samples, and two analyzed placental tissues. A total of 18 microRNAs were found to be upregulated (53,58,64,66,121,122) and 37 microRNAs were found to be downregulated (64,66,121) in the first trimester of pregnancies that progressed to PE. Except for miR-125b (63,66), which was cited by two different studies as upregulated, none of the other microRNAs were cited by more than one study (Table 5).

Table 5 Differentially expressed microRNAs in first trimester

Differentially expressed microRNAs in first trimester		
Upregulated	Downregulated	
let-7a-5p (64)	ebv-miR-BART1-5p (121)	miR-642b-3p (121)
miR-15a-5p (64)	hiv1-miR-TAR-3p (121)	miR-892b (121)
miR-92a-1-3p (64)	miR-22-5p (64)	miR-942 (66)
miR-106a (64)	miR-92a-2-5p (121)	miR-1273c (121)
miR-125b (63,64)	miR-93-5p (64)	miR-2392 (121)
miR-130a-3p (64)	miR-107 (121)	miR-3064-5p (121)
miR-143 (66)	miR-126# (66)	miR-3171 (121)
miR-146b-5p (122)	miR-126-3p (64)	miR-3184-5p (121)
miR-191-5p (64)	miR-127 (66)	miR-3649 (121)
miR-192 (66)	miR-188-3p (121)	miR-4264-5p (64)
miR-320a (121)	miR-203a-3p (121)	miR-4329 (121)
miR-374a-5p (64)	miR-204-3p (64)	miR-4432 (121)

miR-517-5p (53)	miR-211-5p (121)	miR-4482-3p (121)
miR-518b (53)	miR-221 (66)	miR-4498 (121)
miR-520h (53)	miR-365a-3p (64)	miR-4758-5p (121)
miR-574-5p (64)	miR-369-3p (121)	miR-5000-5p (121)
miR-1304-5p (121)	miR-424-3p (121)	miR-5009-3p (121)
miR-5002-5p (121)	miR-506-5p (121)	miR-5582-3p (121)
	miR-559-5p (64)	

miR-125b was found to be upregulated by two studies.

3.2.7 Second trimester

Twenty-three studies (8,68%) assessed microRNA expression levels in the second trimester of pregnancy (from 14 to 27 weeks). Among these, 17 analyzed blood samples only, one analyzed placental tissue and five analyzed both blood and placenta samples. One microRNA (miR-204-5p) was found to be upregulated (123) and 4 (miR-133a, miR-206, miR-210, miR-942) were downregulated (87,116,124) in the second trimester of pregnancies that progressed to PE. No microRNA was cited by more than one study.

3.2.8 Third trimester

One hundred and ninety-seven (74,34%) studies assessed microRNA expression levels in the third trimester of pregnancy (from 28 weeks onwards). A total of 182 microRNAs were found to be upregulated in third trimester samples from women who developed PE, the most frequently cited being: miR-210 (N=23) (10–15,17,19–22,25,27–30,32–36,38,40), miR-155 (N=12) (3,10,14,17,30,42–46,49,50), miR-16 (N=5) (21,59,71–73), miR-181a (N=6) (21,38,57–59,61), and miR-182* (N=4) (25,30,37,88). A total of 166 microRNAs were detected as downregulated in third trimester samples from women who developed PE, the most frequently cited being: miR-363 (N=3) (21,24,38,74), miR-1 (N=3) (28,38,67), miR-16 (N=3) (58,74,80), miR-18a (N=4) (24,38,74,75), miR-18b (N=4) (21,38,81,82), miR-144 (N=4) (38,58,76,77), miR-149 (N=3) (74,78,79) and miR-195 (N=4) (38,83,84,86). The full list of upregulated and downregulated microRNAs in the 3rd trimester is available in the supplemental files.

3.3 Methodological quality

According to the Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale (NOS) for Case Control Studies (8), seven studies scored one point, 22 scored two points, nine scored three points, 26 scored four points, 63 scored five points, 61 scored six points, 32 scored seven points, 42 scored eight points, and three scored nine points.

4 DISCUSSION

Despite extensive efforts of researchers around the world, the etiology of PE is not fully understood. Although immunological, inflammatory, genetic factors and placental ischemia have been implicated in its pathogenesis, the exact mechanism underlying PE remains difficult to understand. Induced preterm labor with complete removal of the placenta remains the only curative treatment option for the management of PE, but this does not guarantee complete resolution of postpartum complications (2), since both women who develop PE and their neonates are at increased risk of developing cardiovascular disease and metabolic syndromes (such as type II diabetes) later in life (3).

MicroRNAs play a role in post-transcriptional regulation of gene expression, through translational inhibition or degradation of messenger RNA. These molecules play key roles in the regulation of diverse biological processes, including cell differentiation, apoptosis, and development (4) and have triggered great interest in the diagnosis and monitoring of various conditions, including cancer, autoimmune, inflammatory, and neurological diseases (10). As the placenta is an important element in the development of PE, miRNAs may be implicated in the pathogenesis of the disease, regulating pathways associated with angiogenesis, hypoxia, ischemia, and metabolism (3).

4.1 MicroRNAs as tools for early PE prediction

Currently, no marker can predict PE during the first trimester, when the process of maladaptive placentation begins (66). In this context, PE-associated miRNAs have the potential to serve as viable biomarkers, since several studies demonstrate the deregulation of placental and circulating miRNAs in PE, implying their involvement in the pathogenesis of the disease (1–3). These studies confirmed the differential expression of miRNAs in placental and circulating blood of women with PE compared to controls, which suggests a key role of this epigenetic mechanism in the altered development of placental vascular structure and subsequent cascade of events.

Due to their great stability in biological fluids (which may be longer than nine months), such as plasma, miRNAs have a great advantage in the application in the early and non-invasive prediction of PE (2,66). In addition, the routine use of molecular biology techniques – which were previously restricted to research laboratories due to its high cost and complexity – has been increasingly widespread in clinical practice, especially after the advent of the Covid-19 pandemic, whose gold standard diagnosis is mainly established by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), the same method used in the detection and quantification of microRNAs (125).

4.2 Most frequently cited upregulated microRNAs

As demonstrated by this study, the most frequently cited microRNA with altered expression levels is miR-210. Being induced by hypoxia-inducible factor-1 α during a hypoxia event, miR-210 acts by regulating several hypoxia response pathways, such as cell survival, angiogenesis, mitochondrial metabolism and DNA repair (2). Winger et al. (126) suggested that miR-210 plays a central role in changing the pattern of trophoblast proliferation, which contributes to the PE pathogenesis. Differential expression of miR-210 was detected in both placenta and blood samples from women with EOPE and LOPE. This is in accordance with the literature, which reports that it is one of the most commonly over-expressed miRNAs in PE. However, it is still unclear whether the differential expression of miR-210 is a cause or a consequence of PE, although this miRNA is one of the main bets for a potential biomarker for PE (1).

Interestingly, when performing the stratified analysis of the data, miR-210 was not one of the microRNAs found to be upregulated in the first and second trimesters of pregnancy, which would be expected due to the mechanisms it regulates. However, it should be noted that some studies did not clearly report the gestational interval in which the samples were collected or included pregnant women with gestational ages that fall into more than one different trimester. Therefore, this result does not necessarily imply that miR-210 is not upregulated in the first gestational trimester, but due to the lack of clarity in the studies when reporting the results, we cannot confirm this information with certainty. In addition, most studies carried out in the first and second trimesters of pregnancy analyzed blood samples, since the collection of placental tissue in early gestation periods represents a risk of miscarriage, being performed only in specific cases and under medical advice.

Regarding the others frequently cited upregulated microRNAs, they have been investigated in *in vitro* studies performed with trophoblastic cells and were shown to act in pathways that play important roles related to PE pathogenesis. According to (17), miR-155 is an essential

regulator of endothelium-dependent vasorelaxation, playing a negative regulatory role in the migratory behavior via modulating endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (17). MiR-518b belongs to the chromosome 19 microRNA cluster (C19MC), and Jelena et al. (52) claim that its upregulation in preeclamptic placentas may contribute to excessive trophoblast proliferation, which is a common pathological change in PE. Regarding miR-181a, its upregulation may lead to downregulation of transforming growth factor beta (TGF- β) signaling and upregulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK), being associated with elevated IL-6 levels in maternal plasma in preeclamptic women (127).

Yang et al. (65) suggested that miR -125b is probably involved in proliferation, apoptosis, invasion and vascular endothelial growth factor (VEGF) production, acting on the mechanisms of hypoxia and immune response, through the production of IL-8 by trophoblast cells. Li et al. (64) report that elevated miR-125b could inhibit trophoblast invasion and angiogenesis, leading to impaired endothelial cell function, poor placentation, and contributing to the PE physiopathology. Suo et al. (70) demonstrated that miR-183 inhibited the invasion and migration of HTR-8/SVneo trophoblast cells via targeting matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). Thus, miR-183 probably suppresses trophoblast cell proliferation, invasion, and angiogenesis, contributing to the development of PE (69). Likewise, miR-16 is involved in the regulation of proliferation, migration, and invasion of trophoblastic cells (71).

4.3 Most frequently cited downregulated microRNAs

As well as the microRNAs frequently reported to be upregulated in PE, the most frequently downregulated microRNAs were also studied through in vitro analyses. In this context, miR-363 has been shown to target placental sodium coupled neutral amino acid transporters, leading to a variation in amino acids transport and nutrient transfer, which would culminate in the manifestation of PE (128). MiR-18a is associated with trophoblast cell invasion, likely via inhibition of TGF- β signaling (129); while miR-144 acts in the regulation of proliferation, migration, and invasion of trophoblastic cells (76), as well as miR-16 (71). These findings suggest that such microRNAs are essential for maintaining the biological function of trophoblast cells and their downregulation can lead to PE development. In a complementary manner, (115) proposed that miR-31, miR-21, and miR-16 regulate various cellular and developmental processes by targeting genes involved in proliferation, invasion, angiogenesis, apoptosis and immune tolerance.

Another microRNA associated with trophoblast proliferation and invasion is miR-18b, which is considered a protective factor against PE, as studies performed in rats showed that high levels of miR-18b contributed to decreased systolic blood pressure, diastolic blood pressure and

proteinuria, parameters that are commonly elevated in PE (81,82). Bai et al. (84) proposed that miR-195 targets genes associated with mechanisms of placental proliferation, apoptosis, and angiogenesis. For this reason, its downregulation contributes to PE pathogenesis by inhibiting cell invasion (58). Meanwhile, miR-149 was reported to be related to cancer metastasis/cell migration (78), as well as in the regulation of endothelial cell function (74).

4.4 Altered microRNAs in Placenta vs Blood

The most relevant microRNAs found to be altered in placenta samples are related to the mechanisms of trophoblast proliferation, migration, invasion, apoptosis and angiogenesis (miR-210 (2); miR-183 (69); miR-16 (71); miR-18b (81,82); miR-195 (130)). Another important via includes the control of angiogenesis through regulation of VEGF production in placenta miR-182* (30,37,88); miR-20a (90,91); miR-20b (89–91)). Additionally, microRNAs regulating endothelium-dependent vasorelaxation (miR-155 (17)), nutrient transfer (miR-363 (128)) and inflammatory response (miR-181a; (127)) were found to possibly contribute to the PE onset.

Similarly, the main mechanisms regulated by the most altered microRNAs in peripheral blood samples were regulation of proliferation, migration, and invasion of trophoblastic cells (miR-16 (71); miR-144 (76); miR-18a (131); miR-518b (52)), angiogenesis (miR-27b-3p (92); miR-210 (2)), endothelium-dependent vasorelaxation via eNOS (miR-155 (17)) and transport of nutrients (miR-363 (128)).

4.5 Altered microRNAs in EOPE vs LOPE

Studies that analyzed samples of pregnant women with EOPE demonstrated that the most frequently altered microRNAs in this group are mainly related to the mechanisms of trophoblast proliferation, migration, invasion, apoptosis and angiogenesis (miR-518b (52); miR-125b (64); miR-16 (71); miR-195 (130); miR-149 (74,78)), as well as eNOS modulation (miR-155 (17)) and amino acids transport and nutrient transfer (miR-363 (128)), which may lead to impaired endothelial cell function and poor placentation.

Meanwhile, the most frequently cited by studies that analyzed pregnant women with LOPE are related to the regulation of angiogenesis, mitochondrial metabolism, DNA repair (miR-210 (2)), inflammation (miR-181a (127)) and regulation of blood pressure (miR-1183 (117)). This is in accordance with the literature, which reports that EOPE shows a greater association with impaired trophoblast invasion, placental ischemia and fetal growth restriction compared to LOPE, whereas in LOPE, maternal constitutive factors or susceptibility to vascular damage

are more relevant. Under this scenario, those with an extremely susceptible vasculature may become preeclamptic simply by the normal adaptation to pregnancy, while those with a healthy vasculature who become preeclamptic may only do so when faced with a major insult arising from defective placentation (4).

4.6 Altered microRNAs in the first and third trimesters

During the first trimester of pregnancy, the most cited microRNA was miR-125b, which acts by inhibiting trophoblast invasion and angiogenesis, leading to impaired endothelial cell function, poor placentation (64). It is important to point out that most of the studies included in this systematic review were conducted during the third trimester of pregnancy and detected changes in the expression levels of several microRNAs involved in many pathways. The most frequently altered microRNAs in third trimester are mainly related to the mechanisms of regulation of proliferation, migration, and invasion of trophoblastic cells (miR-16 (71); miR-144 (76); miR-18a (129); miR-18b (81,82)), placental proliferation, apoptosis, and angiogenesis (miR-195 (130)), amino acids transport and nutrient transfer (miR-363 (128)), regulation of endothelial cell function (miR-149 (74,78)), regulation several hypoxia response pathways (miR-210 (2)), eNOS modulation (miR-155 (17)).

Inadequate vascular remodeling and hypoperfused placenta resulting from superficial cytotrophoblast migration toward the uterine spiral arterioles have been characterized as important precipitating events of PE. The placenta becomes ischemic, resulting in the release of factors associated with maternal vascular endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction is a common phenotype of PE and is characterized by vasoconstriction and decreased blood flow to organs. Furthermore, an increase in immune cells and inflammatory cytokines is associated with endothelial dysfunction during PE (4).

VEGF and placental growth factor (PlGF) play key roles in placental angiogenesis and are thought to be secreted by trophoblastic cells. VEGF is considered essential for the integrity of maternal endothelial cells. Interestingly, increased and decreased levels of VEGF have been found in the maternal circulation in PE. In addition, there is evidence that innate and adaptive immune processes are involved in the pathogenesis of PE. Compared with normal pregnancy, there is a shift in Th-2 to Th-1 type immunity in PE, and the predominant Th1 immunity is related to the poor placentation, exaggerated inflammatory response, and endothelial dysfunction observed in PE (4,36).

Nitric oxide (NO) is a potent vasodilator that causes relaxation of vascular smooth muscle cells through a cyclic guanosine monophosphate pathway. The nitric oxide/nitric oxide synthase

system (NO /NOS) is also known to be altered in PE, as decreased levels of NO and increased levels of arginase (which degrades a precursor molecule in the NOS pathway) have been found in PE. In addition, deficiency of NO correlates with metabolic abnormalities observed in PE, such as hypertension, proteinuria, and platelet dysfunction. Therefore, an intact NOS system is thought to be essential for normal spiral artery remodeling and pregnancy (44).

Several miRNAs contribute to the regulation of the aforementioned processes. As the knowledge of the functional importance of miRNAs in adequate placentation and the development of PE increases, it becomes important to determine which specific miRNAs contributes predominantly to different pathogenic aspects of PE, considering the fact that the subtype of PE is an important clinical variable in predicting both maternal and perinatal outcomes. Although being less frequent, EOPE is associated with higher rates of neonatal mortality, fetal growth restriction and a greater degree of maternal morbidity compared to LOPE, which is also less likely to predict later life cardiovascular disease (22,54,65). In this sense, patterns of miR expression could help link pathological processes to the different classifications of PE, resolving the ambiguity between EOPE and LOPE cases and making it more likely to achieve a correct diagnostic or choosing an effective and personalized preventive therapy.

In addition, samples from early gestational stages have great potential in revealing miRs which may only be transiently expressed, but which may be a biomarker of increased risk of PE. For example, significantly increased expression of miR-125b in the first trimester suggests this may be a useful biomarker of increased risk of PE even months before diagnosis. By expanding the question of contribution towards PE classification, certain miRs expression profiles in the first trimester appear to correlate with worst outcomes, as with miR-125b, miR-143, miR-192, miR-320a, miR518b and miR-518b, since they were increased in EOPE, but not in LOPE. In summary, these findings offer a better understanding of the role of microRNAs in PE and contributes to primary researches that aim to point biomarker predictors for PE.

4.7 Relevance and limitations

The present study is of great relevance to the academic and clinical fields. Systematic reviews represent the type of publication with the highest level of scientific evidence. Therefore, our results will serve to guide future research aimed at determining patterns of microRNA expression in clinical samples from preeclamptic women. In turn, these studies may influence health decision makers to establish tests aimed at the early prediction of the disease, which results in better prognoses for women who develop PE and their offspring.

Some limitations of this study should be commented. The main one is the heterogeneity among the studies and the lack of some important data. The studies included in this review adopted different diagnostic criteria, as well as different inclusion and exclusion criteria. As a result, the groups of pregnant women included in each study vary widely. Participants show differences in their maternal age, gestational age at which biological samples were collected, time and mode of delivery. Several studies do not mention clinical characteristics relevant to the context of PE, such as systolic and diastolic pressure, proteinuria levels, platelet count, liver and kidney function markers, among others. Some studies do not even mention the unit of measurement of some parameters evaluated.

When placental tissue samples were used for analysis, the region of the placenta from which the biopsy was taken varied greatly between studies, with several studies not even describing the chosen region. In the evaluation of circulating microRNAs, both plasma and serum samples were used. The collection and processing of such samples took place under different protocols or were not clearly described.

Due to the aforementioned reasons, it was not possible to carry out a meta-analysis of the collected data, since there are several confounding factors. Therefore, we reinforce the importance of valuing good writing of academic articles, since accurate information of good quality can be used in decision-making in clinical practice, helping medicine and society in general.

The identification of pregnant women at increased risk of PE is the most desirable for obstetricians. This review listed the most frequently cited upregulated and downregulated microRNAs in PE. Certainly, it will serve as a reference to guide future experimental research by our research group, as well as other research groups around the world. The greatest knowledge about expression profiles of microRNAs in PE undoubtedly can help in the development of new protocols for early detection of the risk of developing the disease.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Munaut C, Tebache L, Blacher S, Noël A, Nisolle M, Chantraine F. Dysregulated circulating miRNAs in preeclampsia. *Biomed Rep.* 2016 Dec;5(6):686–92.

2. Jairajpuri DS, Malalla ZH, Mahmood N, Almawi WY. Circulating microRNA expression as predictor of preeclampsia and its severity. *Gene*. 2017 Sep;627:543–8.
3. Lykoudi A, Kolialexi A, Lambrou GI, Braoudaki M, Siristatidis C, Papaioanou GK, et al. Dysregulated placental microRNAs in Early and Late onset Preeclampsia. *Placenta*. 2018 Jan;61:24–32.
4. Sheikh AM, Small HY, Currie G, Delles C. Systematic Review of Micro-RNA Expression in Pre-Eclampsia Identifies a Number of Common Pathways Associated with the Disease. *PLoS One*. 2016 Aug 16;11(8):e0160808.
5. Harapan H, Andalas M. The role of microRNAs in the proliferation, differentiation, invasion, and apoptosis of trophoblasts during the occurrence of preeclampsia—A systematic review. *Tzu Chi Med J*. 2015 Jun;27(2):54–64.
6. Higgins J, James T, (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* version 6.2 (updated February 2021). Cochrane; 2021.
7. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021 Mar 29;n71.
8. Wells G, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta- analyses. 2021.
9. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*. 2016 Dec 5;5(1):210.
10. Ghafari A, Lessan pezeshki M, Saffari M. P0069MICRO RNA 155, 210, 494, 29B AND 34A EXPRESSION PROFILE IN PREECLAMPSIA AND NORMAL PREGNANCIES. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2020 Jun 1;35(Supplement_3).
11. Jairajpuri DS, Malalla ZH, Sarray S, Mahmood N. Analysis of differential expression of hypoxia-inducible microRNA-210 gene targets in mild and severe preeclamptic patients. *Noncoding RNA Res*. 2021 Mar;6(1):51–7.
12. Akgör U, Ayaz L, Çayan F. Expression levels of maternal plasma microRNAs in preeclamptic pregnancies. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2021 Aug 18;41(6):910–4.
13. Wang H, Zhao Y, Luo R, Bian X, Wang Y, Shao X, et al. A positive feedback self-regulatory loop between miR-210 and HIF-1 α mediated by CPEB2 is involved in trophoblast

syncytiolization: implication of trophoblast malfunction in preeclampsia. *Biol Reprod*. 2019 Oct 16;

14. Youssef HMG, Marei ES. Association of MicroRNA-210 and MicroRNA-155 with severity of preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2019 Jul;17:49–53.

15. Wang R, Liu W, Liu X, Liu X, Tao H, Wu D, et al. MicroRNA-210 regulates human trophoblast cell line HTR-8/SVneo function by attenuating Notch1 expression: Implications for the role of microRNA-210 in pre-eclampsia. *Mol Reprod Dev*. 2019 Jul 21;86(7):896–907.

16. Shi Z, Liu B, Li Y, Liu F, Yuan X, Wang Y. MicroRNA-652-3p promotes the proliferation and invasion of the trophoblast HTR-8/SVneo cell line by targeting homeobox A9 to modulate the expression of ephrin receptor B4. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019 Jun;46(6):587–96.

17. Gan L, Liu Z, Wei M, Chen Y, Yang X, Chen L, et al. MiR-210 and miR-155 as potential diagnostic markers for pre-eclampsia pregnancies. *Medicine*. 2017 Jul;96(28):e7515.

18. Adel S, Mansour A, Louka M, Matboli M, Elmekkawi SF, Swelam N. Evaluation of MicroRNA-210 and Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 in Pre-eclampsia. *Gene*. 2017 Jan;596:105–9.

19. Zhou X, Li Q, Xu J, Zhang X, Zhang H, Xiang Y, et al. The aberrantly expressed miR-193b-3p contributes to preeclampsia through regulating transforming growth factor- β signaling. *Sci Rep*. 2016 Jan 29;6(1):19910.

20. Li Q, Long A, Jiang L, Cai L, Xie L, Gu J, et al. Quantification of preeclampsia-related microRNAs in maternal serum. *Biomed Rep*. 2015 Nov;3(6):792–6.

21. Zhang C, Li Q, Ren N, Li C, Wang X, Xie M, et al. Placental miR-106a~363 cluster is dysregulated in preeclamptic placenta. *Placenta*. 2015 Feb;36(2):250–2.

22. Weedon-Fekjær MS, Sheng Y, Sugulle M, Johnsen GM, Herse F, Redman CW, et al. Placental miR-1301 is dysregulated in early-onset preeclampsia and inversely correlated with maternal circulating leptin. *Placenta*. 2014 Sep;35(9):709–17.

23. Ura B, Feriotto G, Monasta L, Bilel S, Zweyer M, Celeghini C. Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2014 Jun;53(2):232–4.

24. Xu P, Zhao Y, Liu M, Wang Y, Wang H, Li Y xia, et al. Variations of MicroRNAs in Human Placentas and Plasma From Preeclamptic Pregnancy. *Hypertension*. 2014 Jun;63(6):1276–84.

25. Betoni JS, Derr K, Pahl MC, Rogers L, Muller CL, Packard RE, et al. MicroRNA analysis in placentas from patients with preeclampsia: comparison of new and published results. *Hypertens Pregnancy*. 2013 Nov 11;32(4):321–39.
26. Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MdM, Kurashina R, Luo SS, Ishikawa T, et al. Hydroxysteroid (17- β) Dehydrogenase 1 Is Dysregulated by Mir-210 and Mir-518c That Are Aberrantly Expressed in Preeclamptic Placentas. *Hypertension*. 2012 Feb;59(2):265–73.
27. Zhang Y, Fei M, Xue G, Zhou Q, Jia Y, Li L, et al. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med*. 2012 Feb;16(2):249–59.
28. Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, Williams MA. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Feb;204(2):178.e12-178.e21.
29. Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, Cruz AC, Chegini N. Expression Profile of MicroRNAs and mRNAs in Human Placentas From Pregnancies Complicated by Preeclampsia and Preterm Labor. *Reproductive Sciences*. 2011 Jan 31;18(1):46–56.
30. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Mar;196(3):261.e1-261.e6.
31. Jin Y, Jia T, Wu X, Wang Y, Sun W, Chen Y, et al. The predictive value of microRNA in early hypertensive disorder complicating pregnancy (HDCP). *Am J Transl Res*. 2021;13(6):7288–93.
32. Biró O, Fóthi Á, Alasztics B, Nagy B, Orbán TI, Rigó J. Circulating exosomal and Argonaute-bound microRNAs in preeclampsia. *Gene*. 2019 Apr;692:138–44.
33. Korkes HA, De Oliveira L, Sass N, Salahuddin S, Karumanchi SA, Rajakumar A. Relationship between hypoxia and downstream pathogenic pathways in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2017 Apr 3;36(2):145–50.
34. Lalevée S, Lapaire O, Bühler M. miR455 is linked to hypoxia signaling and is deregulated in preeclampsia. *Cell Death Dis*. 2014 Sep 4;5(9):e1408–e1408.
35. Luo R, Shao X, Xu P, Liu Y, Wang Y, Zhao Y, et al. MicroRNA-210 Contributes to Preeclampsia by Downregulating Potassium Channel Modulatory Factor 1. *Hypertension*. 2014 Oct;64(4):839–45.

36. Chen J, Zhao L, Wang D, Xu Y, Gao H, Tan W, et al. Contribution of regulatory T cells to immune tolerance and association of microRNA 210 and Foxp3 in preeclampsia. *Mol Med Rep.* 2018 Dec 10;
37. Noack F, Ribbat J, Kähler C, Hoefig K, Chiriac A, Axt-Fliedner R, et al. miRNA-expression profiling in formalin-fixed and paraffin-embedded placental tissue samples from pregnancies with severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2010 Oct 10;282(S1):3–62.
38. Zhu X ming, Han T, Sargent IL, Yin G wu, Yao Y qing. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Jun;200(6):661.e1-661.e7.
39. Gopi K. Micro RNA210 expression in pregnancies with preeclampsia. *Bioinformation.* 2023 Mar 31;19(3):319.
40. Ozler S, Kebapcilar A, Ozdemir EM, Mert M, Arıkan MN, Celik C. Are Vascular Endothelium and Angiogenesis Effective MicroRNA Biomarkers Associated with the Prediction of Early-Onset Preeclampsia (EOPE) and Adverse Perinatal Outcomes? *Reproductive Sciences.* 2024 Mar 17;31(3):803–10.
41. Wang Z, Shan Y, Yang Y, Wang T, Guo Z. MicroRNA-155 is upregulated in the placentas of patients with preeclampsia and affects trophoblast apoptosis by targeting SHH/GLI1/BCL2. *Hum Exp Toxicol.* 2021 Mar 10;40(3):439–51.
42. Nizyaeva N V., Kulikova G V., Nagovitsyna MN, Kan NE, Prozorovskaya KN, Shchegolev AI, et al. Expression of MicroRNA-146a and MicroRNA-155 in Placental Villi in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Bull Exp Biol Med.* 2017 Jul 27;163(3):394–9.
43. Lasabová Z, Vazan M, Zibolenova J, Svecova I. Overexpression of miR-21 and miR-122 in preeclamptic placentas. *Neuro Endocrinol Lett.* 2015 Dec;36(7):695–9.
44. Li X, Li C, Dong X, Gou W. MicroRNA-155 inhibits migration of trophoblast cells and contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia by regulating endothelial nitric oxide synthase. *Mol Med Rep.* 2014 Jul;10(1):550–4.
45. Yang X, Zhang J, Ding Y. Association of microRNA-155, interleukin 17A, and proteinuria in preeclampsia. *Medicine.* 2017 May;96(18):e6509.
46. Zhang Y, Diao Z, Su L, Sun H, Li R, Cui H, et al. MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61. *Am J Obstet Gynecol.* 2010 May;202(5):466.e1-466.e7.

47. Kim JH, Kim JY, Park M, Kim S, Kim T, Kim J, et al. NF- κ B-dependent miR-31/155 biogenesis is essential for TNF- α -induced impairment of endothelial progenitor cell function. *Exp Mol Med*. 2020 Aug 7;52(8):1298–309.
48. Artemieva KA, Nizyaeva N V., Baev OR, Romanov AYu, Khlestova G V., Boltovskaya MN, et al. Regulation of the Placental Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Dokl Biochem Biophys*. 2022 Dec 29;507(1):256–63.
49. Mamdouh Shoeib S, Elwy Abdeldaim D, Samir Mashal S, Raafat Ibrahim R, Mohamed Dawood L, Shatat D, et al. The Ratio of Cysteine-Rich Angiogenic Inducer 61 to MicroRNA - 155 Expression as a Preeclampsia Diagnostic Marker and Predictor of Its Severity. *Rep Biochem Mol Biol*. 2023 Aug 1;12(2):332–9.
50. Wang Z, Liu D, Dai Y, Li R, Zheng Y, Zhao G, et al. Elevated Placental microRNA-155 Is a Biomarker of a Preeclamptic Subtype. *Hypertension*. 2023 Feb;80(2):370–84.
51. Demirer S, Hocaoglu M, Bayrak A.E. Determination of the relationship between early preeclampsia and mir518b in maternal blood. *Gazi Medical Journal*. 2019;30(1):P9.
52. Jelena M, Sopić M, Joksić I, Zmrzljak UP, Karadžov-Orlić N, Košir R, et al. Placenta-specific plasma miR518b is a potential biomarker for preeclampsia. *Clin Biochem*. 2020 May;79:28–33.
53. Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, Krofta L. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs and the evaluation of their potential to predict the onset of preeclampsia and IUGR. *PLoS One*. 2017 Feb 9;12(2):e0171756.
54. Demirer S, Hocaoglu M, Turgut A, Karateke A, Komurcu-Bayrak E. Expression profiles of candidate microRNAs in the peripheral blood leukocytes of patients with early- and late-onset preeclampsia versus normal pregnancies. *Pregnancy Hypertens*. 2020 Jan;19:239–45.
55. Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Tsukamoto O, Hasegawa Y, Abe S, et al. Circulating chromosome 19 miRNA cluster microRNAs in pregnant women with severe preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2015 Oct;41(10):1526–32.
56. Hocaoglu M. Expression Profiles of MIR-155-5P and MIR-518B Micromnas in Circulating Leukocytes of the Pregnant Patients with Preeclampsia and Polycystic Ovary Syndrome. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*. 2023;19(4):426–34.
57. Khaliq OP, Murugesan S, Moodley J, Mackraj I. Differential expression of miRNAs are associated with the insulin signaling pathway in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2018 Nov 17;40(8):744–51.

58. Wu L, Zhou H, Lin H, Qi J, Zhu C, Gao Z, et al. Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *REPRODUCTION*. 2012 Mar;143(3):389–97.
59. Hu Y, Li P, Hao S, Liu L, Zhao J, Hou Y. Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clin Chem Lab Med*. 2009 Jan 1;47(8).
60. Nizyaeva N V., Kulikova G V., Nagovitsyna MN, Kan NE, Prozorovskaya KN, Shchegolev AI. Change in OncomicroRNA Expression in the Placenta during Preeclampsia. *Bull Exp Biol Med*. 2018 Oct 23;165(6):793–7.
61. Ayoub SE, Shaker OG, Aboshama RA, Etman MK, Khalefa AA, khamiss Abd elguaad MM, et al. Expression profile of LncRNA ANRIL, miR-186, miR-181a, and MTMR-3 in patients with preeclampsia. *Noncoding RNA Res*. 2023 Dec;8(4):481–6.
62. Tang J, Wang D, Lu J, Zhou X. MiR-125b participates in the occurrence of preeclampsia by regulating the migration and invasion of extravillous trophoblastic cells through STAT3 signaling pathway. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2021 Mar 4;41(2):202–8.
63. Licini C, Avellini C, Picchiassi E, Mensà E, Fantone S, Ramini D, et al. Pre-eclampsia predictive ability of maternal miR-125b: a clinical and experimental study. *Translational Research*. 2021 Feb;228:13–27.
64. Li Q, Han Y, Xu P, Yin L, Si Y, Zhang C, et al. Elevated microRNA-125b inhibits cytotrophoblast invasion and impairs endothelial cell function in preeclampsia. *Cell Death Discov*. 2020 May 13;6(1):35.
65. Yang W, Wang A, Zhao C, Li Q, Pan Z, Han X, et al. miR-125b Enhances IL-8 Production in Early-Onset Severe Preeclampsia by Targeting Sphingosine-1-Phosphate Lyase 1. *PLoS One*. 2016 Dec 9;11(12):e0166940.
66. Luque A, Farwati A, Crovetto F, Crispi F, Figueras F, Gratacós E, et al. Usefulness of circulating microRNAs for the prediction of early preeclampsia at first-trimester of pregnancy. *Sci Rep*. 2014 May 8;4(1):4882.
67. Simsek F, Turunc E, Keskin-Arslan E, Erol H, Acar S, Atakul BK, et al. Molecular mechanisms involved in pre-eclampsia through expressional regulation of endothelin-1. *Placenta*. 2022 Jun;124:55–61.
68. Zhu H, Wang C. Retracted : HDAC2 -mediated proliferation of trophoblast cells requires the miR-183/FOXA1/IL-8 signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2021 Apr 8;236(4):2544–58.

69. Lai W, Yu L. Elevated MicroRNA 183 Impairs Trophoblast Migration and Invasiveness by Downregulating FOXP1 Expression and Elevating GNG7 Expression during Preeclampsia. *Mol Cell Biol*. 2021 Jan 1;41(1).
70. Suo M, Sun Y, Yang H, Ji J, He Y, Dong L, et al. miR-183-5p suppressed the invasion and migration of HTR-8/SVneo trophoblast cells partly via targeting MMP-9 in preeclampsia. *Biosci Rep*. 2020 Jun 26;40(6).
71. Zhao X, Liu F, Zhang J, Zhang J, Zhang L, Chen L. LINC01128 - miR-16 interaction regulates the migration and invasion of human chorionic trophoblast cells. *Hypertens Pregnancy*. 2021 Apr 3;40(2):152–61.
72. Ali Z, Zafar U, Zaki S, Ahmad S, Khaliq S, Lone KP. Expression levels of MiRNA-16, SURVIVIN and TP53 in Preeclamptic and Normotensive women. *J Pak Med Assoc*. 2021 Sep;71(9):2208–13.
73. Li T, Zhou B, He Y, Liu J, Li Y. Expression and clinical diagnostic value of miR-383 in patients with severe preeclampsia. *Cell Mol Biol*. 2020 Jun 5;66(3):92–100.
74. Whigham CA, MacDonald TM, Walker SP, Hiscock R, Hannan NJ, Pritchard N, et al. MicroRNAs 363 and 149 are differentially expressed in the maternal circulation preceding a diagnosis of preeclampsia. *Sci Rep*. 2020 Oct 22;10(1):18077.
75. Yousefzadeh Y, Soltani-Zangbar MS, Kalafi L, Tarbiat A, Shahmohammadi Farid S, Aghebati-Maleki L, et al. Evaluation of CD39, CD73, HIF-1 α , and their related miRNAs expression in decidua of preeclampsia cases compared to healthy pregnant women. *Mol Biol Rep*. 2022 Nov 1;49(11):10183–93.
76. Xiao J, Tao T, Yin Y, Zhao L, Yang L, Hu L. miR-144 may regulate the proliferation, migration and invasion of trophoblastic cells through targeting PTEN in preeclampsia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Oct;94:341–53.
77. Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal Plasma miRNAs Expression in Preeclamptic Pregnancies. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1–9.
78. Guo L, Tsai SQ, Hardison NE, James AH, Motsinger-Reif AA, Thames B, et al. Differentially expressed microRNAs and affected biological pathways revealed by modulated modularity clustering (MMC) analysis of human preeclamptic and IUGR placentas. *Placenta*. 2013 Jul;34(7):599–605.
79. Ellakwa DES, Rashed LA, El-Mandoury AAA, Younis NF. Epigenetic alterations in preeclampsia: a focus on microRNA149 and tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in Egyptian women. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*. 2024 Jun 7;

80. Witvrouwen I, Mannaerts D, Ratajczak J, Boeren E, Faes E, Van Craenenbroeck AH, et al. MicroRNAs targeting VEGF are related to vascular dysfunction in preeclampsia. *Biosci Rep*. 2021 Aug 27;41(8).
81. Wang S, Wang X, Weng Z, Zhang S, Ning H, Li B. Expression and role of microRNA 18b and hypoxia inducible factor 1 α in placental tissues of preeclampsia patients. *Exp Ther Med*. 2017 Aug 30;
82. Yang Z, Shan N, Deng Q, Wang Y, Hou Y, Mei J, et al. Extracellular vesicle-derived microRNA-18b ameliorates preeclampsia by enhancing trophoblast proliferation and migration via Notch2/TIM3/mTORC1 axis. *J Cell Mol Med*. 2021 May 9;25(10):4583–95.
83. Gunel T, Kamali N, Hosseini MK, Gumusoglu E, Benian A, Aydinli K. Regulatory effect of miR-195 in the placental dysfunction of preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2018 Mar 18;33(6):901–8.
84. Bai Y, Yang W, Yang H xia, Liao Q, Ye G, Fu G, et al. Downregulated miR-195 Detected in Preeclamptic Placenta Affects Trophoblast Cell Invasion via Modulating ActRIIA Expression. *PLoS One*. 2012 Jun 19;7(6):e38875.
85. Wang H, Zhang L, Guo X, Bai Y, Li YX, Sha J, et al. MiR-195 modulates oxidative stress-induced apoptosis and mitochondrial energy production in human trophoblasts via flavin adenine dinucleotide-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1 and pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit. *J Hypertens*. 2018 Feb;36(2):306–18.
86. Chen Y, Zhou C, Zhao X, Che R, Wu Y, Wan S, et al. Extracellular Vesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Promote Trophoblast Cell Proliferation and Migration by Targeting TFPI2 in Preeclampsia. *Stem Cells Int*. 2023 Aug 1;2023:1–10.
87. Trongpisutsak A, Phupong V. Prediction of preeclampsia using a combination of serum micro RNA-210 and uterine artery Doppler ultrasound. *Sci Prog*. 2021 Jul 25;104(3):003685042110368.
88. Noack F, Ribbat-Idel J, Thorns C, Chiriac A, Axt-Flidner R, Diedrich K, et al. miRNA expression profiling in formalin-fixed and paraffin-embedded placental tissue samples from pregnancies with severe preeclampsia. *J Perinat Med*. 2011 Jan 1;39(3).
89. Jin M, Li H, Xu H, Huo G, Yao Y. MicroRNA-20b inhibits trophoblast cell migration and invasion by targeting MMP-2. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(11):10901–9.
90. Wang W, Feng L, Zhang H, Hachy S, Satohisa S, Laurent LC, et al. Preeclampsia Up-Regulates Angiogenesis-Associated MicroRNA (i.e ., miR-17, -20a, and -20b) That Target

Ephrin-B2 and EPHB4 in Human Placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jun 1;97(6):E1051–9.

91. Hu TX, Wang G, Guo XJ, Sun QQ, He P, Gu H, et al. MiR 20a,-20b and -200c are involved in hydrogen sulfide stimulation of VEGF production in human placental trophoblasts. *Placenta.* 2016 Mar;39:101–10.

92. Gusar V, Timofeeva A, Chagovets V, Kan N, Vasilchenko O, Prozorovskaya K, et al. Preeclampsia: The Interplay between Oxygen-Sensitive miRNAs and Erythropoietin. *J Clin Med.* 2020 Feb 20;9(2):574.

93. Yang Y, Tang F, Zhao X. miR-27b-3p is Highly Expressed in Serum of Patients with Preeclampsia and has Clinical Significance. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2022 May;22(6):612–9.

94. Zhu L, Liu Z. Serum from patients with hypertension promotes endothelial dysfunction to induce trophoblast invasion through the miR 27b 3p/ATPase plasma membrane Ca²⁺ transporting 1 axis. *Mol Med Rep.* 2021 Mar 3;23(5):319.

95. Martinez-Fierro ML, Garza-Veloz I. Analysis of Circulating microRNA Signatures and Preeclampsia Development. *Cells.* 2021 Apr 24;10(5):1003.

96. Abbas AM, Youssef F, Gomaa AM, Kamal DT, Abd Allah ES, Ahmed MA. 418 Role of miRNA-452 expression in the pathogenesis of early onset preeclampsia: a case-control study. *Am J Obstet Gynecol.* 2021 Feb;224(2):S268–9.

97. Liu B, Liu L, Cui S, Qi Y, Wang T. Expression and significance of <sc>microRNA</sc> -126 and <sc>VCAM</sc> -1 in placental tissues of women with early-onset preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.* 2021 Jun 10;47(6):2042–50.

98. Zhang H, Xue L, Lv Y, Yu X, Zheng Y, Miao Z, et al. Integrated microarray analysis of key genes and a miRNA mRNA regulatory network of early onset preeclampsia. *Mol Med Rep.* 2020 Sep 30;22(6):4772–82.

99. Awamleh Z, Gloor GB, Han VKM. Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: potential impact on gene expression and pathophysiology. *BMC Med Genomics.* 2019 Dec 27;12(1):91.

100. Wang Y, Lumbers ER, Arthurs AL, de Meaultsart CC, Mathe A, Avery-Kiejda KA, et al. Regulation of the human placental (pro)renin receptor-prorenin-angiotensin system by microRNAs. *MHR: Basic science of reproductive medicine.* 2018 Jul 28;

101. Shao X, Liu Y, Liu M, Wang Y, Yan L, Wang H, et al. Testosterone Represses Estrogen Signaling by Upregulating miR-22. *Hypertension*. 2017 Apr;69(4):721–30.
102. Lu TM, Lu W, Zhao LJ. MicroRNA-137 Affects Proliferation and Migration of Placenta Trophoblast Cells in Preeclampsia by Targeting ERR α . *Reproductive Sciences*. 2017 Jan 1;24(1):85–96.
103. Yang HY. MiR-133b regulates oxidative stress injury of trophoblasts in preeclampsia by mediating the JAK2/STAT3 signaling pathway. *J Mol Histol*. 2021 Dec 8;52(6):1177–88.
104. Li Z, Wang J, Li D, Chen H, Meng T. miR 372 3p promotes preeclampsia progression by regulating twist1. *Exp Ther Med*. 2022 Oct 19;24(6):723.
105. Vijayan V, Kannan R, Subhashini Y, Tarakeswari S, Reddy BR, Bangaraiahgari R, et al. QUANTIFICATION OF VARIED MIRNAS IN EARLY AND LATE-ONSET PREECLAMPSIA COMPLICATING PREGNANCIES IN SOUTH INDIAN WOMEN-A COHORT STUDY. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5484 IJPSR [Internet]. 2023;14(11):5484–92. Available from: <https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.14>
106. Pallavi Arora, Sankat Mochan, Sunil Kumar Gupta, Neerja Rani, Pallavi Kshetrapal, Sadanand Dwivedi, et al. MicroRNA-22, Specificity protein-1 and Cystathionine β -synthase in early onset Preeclampsia: significance in trophoblast invasion. *BioRxiv* [Internet]. 2023; Available from: <https://doi.org/10.1101/2023.03.08.531738>
107. Lei D, Fang C, Deng N, Yao B, Fan C. Long noncoding RNA expression profiling identifies MIR210HG as a novel molecule in severe preeclampsia. *Life Sci*. 2021 Apr;270:119121.
108. Jiang Y, Luo T, Xia Q, Tian J, Yang J. microRNA-140-5p from human umbilical cord mesenchymal stem cells–released exosomes suppresses preeclampsia development. *Funct Integr Genomics*. 2022 Oct 28;22(5):813–24.
109. Wang L, Shi L, Zhou B, Hong L, Gong H, Wu D. METTL3-mediated lncRNA HOXD-AS1 stability regulates inflammation, and the migration and invasion of trophoblast cells via the miR-135a/ β -TRCP axis. *Noncoding RNA Res*. 2024 Mar;9(1):12–23.
110. Liao G, Cheng D, Li J, Hu S. Clinical significance of microRNA-320a and insulin-like growth factor-1 receptor in early-onset preeclampsia patients. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2021 Aug;263:164–70.
111. Lip S V., Boekschoten M V., Hooiveld GJ, van Pampus MG, Scherjon SA, Plösch T, et al. Early-onset preeclampsia, plasma microRNAs, and endothelial cell function. *Am J Obstet Gynecol*. 2020 May;222(5):497.e1-497.e12.

112. Pallavi Arora, Sankat Mochan, Sunil Kumar Gupta, Neerja Rani, Pallavi Kshetrapal, Sadanand Dwivedi, et al. Abnormal trophoblast invasion in early onset preeclampsia: involvement of cystathionine β -synthase, specificity protein 1 and miR-22. *BioRxiv [Internet]*. 2023; Available from: <https://doi.org/10.1101/2023.03.08.531728>
113. Soobryan N, Kumar A, Moodley J, Mackraj I. The role and expression of pro/antiangiogenic factors and microRNAs in gestational hypertension and pre-eclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2023 Nov;290:38–42.
114. Senousy MA, Shaker OG, Elmaasrawy AHZ, Ashour AM, Alsufyani SE, Arab HH, et al. Serum lncRNAs TUG1, H19, and NEAT1 and their target miR-29b/SLC3A1 axis as possible biomarkers of preeclampsia: Potential clinical insights. *Noncoding RNA Res*. 2024 Dec;9(4):995–1008.
115. Dong K, Zhang X, Ma L, Gao N, Tang H, Jian F, et al. Downregulations of circulating miR-31 and miR-21 are associated with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2019 Jul;17:59–63.
116. Zhang Y, Huang G, Zhang Y, Yang H, Long Y, Liang Q, et al. MiR-942 decreased before 20 weeks gestation in women with preeclampsia and was associated with the pathophysiology of preeclampsia in vitro. *Clin Exp Hypertens*. 2017 Feb 17;39(2):108–13.
117. Gunel T, Hosseini MK, Gumusoglu E, Kisakesen HI, Benian A, Aydinli K. Expression profiling of maternal plasma and placenta microRNAs in preeclamptic pregnancies by microarray technology. *Placenta*. 2017 Apr;52:77–85.
118. Zhou Q, Li H, Zhang Y, Peng W, Hou H, Gu M, et al. MicroRNA-513c-5p is involved in the pathogenesis of preeclampsia by regulating of low-density lipoprotein receptor-associated protein 6. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2021 Dec 20;21(1):837.
119. Timofeeva A V., Gusar VA, Kan NE, Prozorovskaya KN, Karapetyan AO, Bayev OR, et al. Identification of potential early biomarkers of preeclampsia. *Placenta*. 2018 Jan;61:61–71.
120. Mavreli D, Lykoudi A, Lambrou G, Papaioannou G, Vrachnis N, Kalantaridou S, et al. Deep Sequencing Identified Dysregulated Circulating MicroRNAs in Late Onset Preeclampsia. *In Vivo (Brooklyn)*. 2020 Aug 31;34(5):2317–24.
121. Zhong Y, Zhu F, Ding Y. Differential microRNA expression profile in the plasma of preeclampsia and normal pregnancies. *Exp Ther Med*. 2019 Jun 3;

122. Ning W, Chen Y, Chen Y, Zhang H, Wu B, Wen C. Correlation and predictive value of serum miR-146b-5p expression during the first trimester of pregnancy with pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2022 Nov 17;42(8):3537–44.
123. Luizon MR, Conceição IMCA, Viana-Mattioli S, Caldeira-Dias M, Cavalli RC, Sandrim VC. 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. *Front Physiol*. 2021 Sep 22;12.
124. Ma R, Lu Y, Dou C, Gu Q. Clinical significance of miR-133a and miR-206 in pregnant women with preeclampsia and correlation with pregnancy outcomes. *Int J Clin Exp Med*. 2019;12(9):7383–91.
125. Habibzadeh P, Mofatteh M, Silawi M, Ghavami S, Faghihi MA. Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2021 Aug 18;58(6):385–98.
126. Winger EE, Reed JL, Ji X, Nicolaidis K. Peripheral blood cell microRNA quantification during the first trimester predicts preeclampsia: Proof of concept. *PLoS One*. 2018 Jan 2;13(1):e0190654.
127. Liu L, Wang Y, Fan H, Zhao X, Liu D, Hu Y, et al. MicroRNA-181a Regulates Local Immune Balance by Inhibiting Proliferation and Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2012 Aug 24;30(8):1756–70.
128. Abdelazim SA, Shaker OG, Aly YAH, Senousy MA. Uncovering serum placental-related non-coding RNAs as possible biomarkers of preeclampsia risk, onset and severity revealed MALAT-1, miR-363 and miR-17. *Sci Rep*. 2022 Jan 24;12(1):1249.
129. Xu B, Geng X, Liu X, Liu Y. Long non-coding RNA FAM99A modulated YAP1 to affect trophoblast cell behaviors in preeclampsia by sponging miR-134-5p. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2020;53(12).
130. Wu H, Wang H, Liu M, Bai Y, Li Y xia, Ji L, et al. MiR-195 participates in the placental disorder of preeclampsia via targeting activin receptor type-2B in trophoblastic cells. *J Hypertens*. 2016 Jul;34(7):1371–9.
131. Xu P, Li Z, Wang Y, Yu X, Shao X, Li Y xia, et al. miR-18a Contributes to Preeclampsia by Downregulating Smad2 (Full Length) and Reducing TGF- β Signaling. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020 Dec;22:542–56.

132. Luo S, Li H, Cao N, Tang Y, Gu W. MicroRNA-148a affects functions of placental trophoblast cells in preeclampsia by regulating HLA-G. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(5):5205–12.
133. Gao S, Wang Y, Han S, Zhang Q. Up-regulated microRNA-300 in maternal whole peripheral blood and placenta associated with pregnancy-induced hypertension and preeclampsia. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(4):4232–42.
134. Zhao X, Zhang X, Wu Z, Mei J, Li L, Wang Y. Up-regulation of microRNA-135 or silencing of PCSK6 attenuates inflammatory response in preeclampsia by restricting NLRP3 inflammasome. *Molecular Medicine*. 2021 Dec 23;27(1):82.
135. Hu Z, Dong C, Dong Q. Circ_0015382 is associated with preeclampsia and regulates biological behaviors of trophoblast cells through miR-149-5p/TFPI2 axis. *Placenta*. 2021 May;108:73–80.
136. Yin A, Chen Q, Zhong M, Jia B. MicroRNA-138 improves LPS-induced trophoblast dysfunction through targeting RELA and NF- κ B signaling. *Cell Cycle*. 2021 Mar 19;20(5–6):508–21.
137. Gai S, Sun L, Wang H, Yang P. Circular RNA hsa_circ_0007121 regulates proliferation, migration, invasion, and epithelial–mesenchymal transition of trophoblast cells by miR-182-5p/PGF axis in preeclampsia. *Open Medicine*. 2020 Oct 14;15(1):1061–71.
138. Zhang M, Li P, Mao X, Zhang H. Regulatory mechanism of $\langle \text{sc} \rangle \text{miR} \langle / \text{sc} \rangle$ -525-5p in over-invasion of trophoblast. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2021 Feb;47(2):679–88.
139. Dong X, Zhao J, Han J, Han XJ, Zhao CM, Zou AX, et al. MiR-222-5p promotes the growth and migration of trophoblasts by targeting AHNAK. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Nov;24(21):10954–9.
140. Liu E, Zhou Y, Li J, Zhang D. MicroRNA 491 5p inhibits trophoblast cell migration and invasion through targeting matrix metalloproteinase 9 in preeclampsia. *Mol Med Rep*. 2020 Oct 14;22(6):5033–40.
141. Song H, Wang X, Li JC, Lv YH. MiR-655-3p inhibits growth and invasiveness of trophoblasts via targeting PBX3 and thus deteriorates preeclampsia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Oct;24(20):10346–51.

142. Tao J, Xia LZ, Liang L, Chen Y, Wei D, Meng J, et al. MiR-124-3p promotes trophoblast cell HTR-8/SVneo pyroptosis by targeting placental growth factor. *Placenta*. 2020 Nov;101:176–84.
143. Han L, Luo QQ, Peng MG, Zhang Y, Zhu XH. miR-483 is downregulated in pre-eclampsia via targeting insulin-like growth factor 1 (IGF1) and regulates the PI3K/Akt/mTOR pathway of endothelial progenitor cells. *J Obstet Gynaecol Res*. 2021 Jan;47(1):63–72.
144. Fan Y, Dong Z, Zhou G, Fu J, Zhan L, Gao M, et al. Elevated miR-23a impairs trophoblast migration and invasiveness through HDAC2 inhibition and NF- κ B activation. *Life Sci*. 2020 Nov;261:118358.
145. Zheng W, Chen A, Yang H, Hong L. MicroRNA 27a inhibits trophoblast cell migration and invasion by targeting SMAD2: Potential role in preeclampsia. *Exp Ther Med*. 2020 Jun 24;
146. Sheng C, Zhao Y, Zhu L. Down-regulation of EDN1 gene expression by circulating miR-206 is associated with risk of preeclampsia. *Medicine*. 2020 May 29;99(22):e20319.
147. Yang X, Meng T. miR-215-5p decreases migration and invasion of trophoblast cells through regulating CDC6 in preeclampsia. *Cell Biochem Funct*. 2020 Jun 23;38(4):472–9.
148. Lv Y, Lu X, Li C, Fan Y, Ji X, Long W, et al. miR-145-5p promotes trophoblast cell growth and invasion by targeting FLT1. *Life Sci*. 2019 Dec;239:117008.
149. Xie N, Jia Z, Li L. miR 320a upregulation contributes to the development of preeclampsia by inhibiting the growth and invasion of trophoblast cells by targeting interleukin 4. *Mol Med Rep*. 2019 Aug 8;
150. Yang H li, Zhang H zhi, Meng F rong, Han S yi, Zhang M. Differential expression of microRNA-411 and 376c is associated with hypertension in pregnancy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2019;52(4).
151. Liu E, Liu Z, Zhou Y, Chen M, Wang L, Li J. MicroRNA 142 3p inhibits trophoblast cell migration and invasion by disrupting the TGF β 1/Smad3 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2019 Mar 1;
152. Fu JY, Xiao YP, Ren CL, Guo YW, Qu DH, Zhang JH, et al. Up-regulation of miR-517-5p inhibits ERK/MMP-2 pathway: potential role in preeclampsia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Oct;22(20):6599–608.
153. Fang YN, Huang ZL, Li H, Tan WB, Zhang QG, Wang L, et al. Highly expressed miR-182-5p can promote preeclampsia progression by degrading RND3 and inhibiting HTR-8/SVneo cell invasion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Oct;22(20):6583–90.

154. Huang X, Wu L, Zhang G, Tang R, Zhou X. Elevated MicroRNA-181a-5p Contributes to Trophoblast Dysfunction and Preeclampsia. *Reproductive Sciences*. 2019 Aug 30;26(8):1121–9.
155. Wang N, Li R, Xue M. Potential regulatory network in the PSG10P/miR-19a-3p/IL1RAP pathway is possibly involved in preeclampsia pathogenesis. *J Cell Mol Med*. 2019 Feb;23(2):852–64.
156. Li J, Du J, Wang Z, Wang C, Bai J, Zhang S. Expression of miR 376 in blood of pregnant women with preeclampsia and its effect on 25 hydroxyvitamin D. *Exp Ther Med*. 2018 Jul 3;
157. Wang F, Yan J. MicroRNA-454 is involved in regulating trophoblast cell proliferation, apoptosis, and invasion in preeclampsia by modulating the expression of ephrin receptor B4. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018 Nov;107:746–53.
158. Liu F, Wu K, Wu W, Chen Y, Wu H, Wang H, et al. miR 203 contributes to pre eclampsia via inhibition of VEGFA expression. *Mol Med Rep*. 2018 Feb 2;
159. Niu Z ru, Han T, Sun X luan, Luan L xia, Gou W li, Zhu X ming. MicroRNA-30a-3p is overexpressed in the placentas of patients with preeclampsia and affects trophoblast invasion and apoptosis by its effects on IGF-1. *Am J Obstet Gynecol*. 2018 Feb;218(2):249.e1-249.e12.
160. Guo M, Zhao X, Yuan X, Li P. Elevated microRNA-34a contributes to trophoblast cell apoptosis in preeclampsia by targeting BCL-2. *J Hum Hypertens*. 2017 Dec 12;31(12):815–20.
161. Fang M, Du H, Han B, Xia G, Shi X, Zhang F, et al. Hypoxia-inducible microRNA-218 inhibits trophoblast invasion by targeting LASP1: Implications for preeclampsia development. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017 Jun;87:95–103.
162. Wang Y, Yang X, Yang Y, Wang W, Zhao M, Liu H, et al. High-throughput deep screening and identification of four peripheral leucocyte microRNAs as novel potential combination biomarkers for preeclampsia. *Journal of Perinatology*. 2016 Apr 17;36(4):263–7.
163. Sun M, Chen H, Liu J, Tong C, Meng T. MicroRNA-34a inhibits human trophoblast cell invasion by targeting MYC. *BMC Cell Biol*. 2015 Dec 3;16(1):21.
164. Ding J, Huang F, Wu G, Han T, Xu F, Weng D, et al. MiR-519d-3p Suppresses Invasion and Migration of Trophoblast Cells via Targeting MMP-2. *PLoS One*. 2015 Mar 24;10(3):e0120321.

165. Hong F, Li Y, Xu Y. Decreased placental miR-126 expression and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia. *Journal of International Medical Research*. 2014 Dec 23;42(6):1243–51.
166. Li Q, Pan Z, Wang X, Gao Z, Ren C, Yang W. miR-125b-1-3p inhibits trophoblast cell invasion by targeting sphingosine-1-phosphate receptor 1 in preeclampsia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Oct;453(1):57–63.
167. Fan Z, Wang Q, Deng H. Circ_0011460 upregulates HTRA1 expression by sponging miR-762 to suppress HTR8/SVneo cell growth, migration, and invasion. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2021 Nov 26;86(5).
168. Chu X, Gu Y, Sheng W, Sun J, Morgan JA, Lewis DF, et al. Downregulation of miR-126-3p expression contributes to increased inflammatory response in placental trophoblasts in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2021 Apr;144:103281.
169. Yu Y, An X, Fan D. Histone Deacetylase Sirtuin 2 Enhances Viability of Trophoblasts Through p65-Mediated MicroRNA-146a/ACKR2 Axis. *Reproductive Sciences*. 2021 May 6;28(5):1370–81.
170. Chen J, Zhan Y, Xu J, Wang Y, Gao Q. EGR1 Overexpression Inhibits the Occurrence of Preeclampsia by Binding to MicroRNA-574 Promoter and Upregulating GAB1. *Reproductive Sciences*. 2021 Apr 19;28(4):1112–21.
171. Ni H, Wang X, Qu H, Gao X, Yu X. MiR-95-5p involves in the migration and invasion of trophoblast cells by targeting low density lipoprotein receptor-related protein 6. *J Obstet Gynaecol Res*. 2021 Jan;47(1):184–97.
172. Mi C, Ye B, Gao Z, Du J, Li R, Huang D. BHLHE40 plays a pathological role in pre-eclampsia through upregulating SNX16 by transcriptional inhibition of miR-196a-5p. *Mol Hum Reprod*. 2020 Jul 1;26(7):532–48.
173. Zhang L, Li H, Li M, Zhang W, Yang Z, Zhang S. LRP6 is involved in the proliferation, migration and invasion of trophoblast cells via miR 346. *Int J Mol Med*. 2020 Apr 8;
174. Liu R, Wang X, Yan Q. The regulatory network of lncRNA DLX6-AS1/miR-149-5p/ERP44 is possibly related to the progression of preeclampsia. *Placenta*. 2020 Apr;93:34–42.
175. Qian S, Liu R. miR-30b facilitates preeclampsia through targeting MXRA5 to inhibit the viability, invasion and apoptosis of placental trophoblast cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(11):4057–65.

176. Cao G, Cui R, Liu C, Zhang Z. MicroRNA regulation of transthyretin in trophoblast biofunction and preeclampsia. *Arch Biochem Biophys*. 2019 Nov;676:108129.
177. Yang X, Guo F. miR 342 3p suppresses cell migration and invasion in preeclampsia by targeting platelet derived growth factor receptor α . *Mol Med Rep*. 2019 Jun 10;
178. Xue F, Yang J, Li Q, Zhou H. Down-regulation of microRNA-34a-5p promotes trophoblast cell migration and invasion via targetting Smad4. *Biosci Rep*. 2019 Feb 28;39(2).
179. Chi Z, Zhang M. Exploration of the regulation and control mechanisms of miR 145 in trophoblast cell proliferation and invasion. *Exp Ther Med*. 2018 Oct 23;
180. Shi Z, She K, Li H, Yuan X, Han X, Wang Y. MicroRNA-454 contributes to sustaining the proliferation and invasion of trophoblast cells through inhibiting Nodal/ALK7 signaling in pre-eclampsia. *Chem Biol Interact*. 2019 Jan;298:8–14.
181. Yang X, Meng T. MicroRNA-431 affects trophoblast migration and invasion by targeting ZEB1 in preeclampsia. *Gene*. 2019 Jan;683:225–32.
182. Wu L, Song W yan, Xie Y, Hu L li, Hou X man, Wang R, et al. miR-181a-5p suppresses invasion and migration of HTR-8/SVneo cells by directly targeting IGF2BP2. *Cell Death Dis*. 2018 Jan 16;9(2):16.
183. Gao Y, She R, Wang Q, Li Y, Zhang H. Up-regulation of miR-299 suppressed the invasion and migration of HTR-8/SVneo trophoblast cells partly via targeting HDAC2 in pre-eclampsia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018 Jan;97:1222–8.
184. Jiang L, Long A, Tan L, Hong M, Wu J, Cai L, et al. Elevated microRNA-520g in pre-eclampsia inhibits migration and invasion of trophoblasts. *Placenta*. 2017 Mar;51:70–5.
185. Xu Y, Huang X, Xie J, Chen Y, Fu J, Wang L. Let-7i-Induced Atg4B Suppression Is Essential for Autophagy of Placental Trophoblast in Preeclampsia. *J Cell Physiol*. 2017 Sep;232(9):2581–9.
186. Jiang F, Li J, Wu G, Miao Z, Lu L, Ren G, et al. Upregulation of microRNA-335 and microRNA-584 contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia through downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Mol Med Rep*. 2015 Oct;12(4):5383–90.
187. Du M, Wu S, Chen J, Liu X, Yu P, Wang L. Diagnostic Value and Clinical Significance of MicroRNA-193b-5p in Hypertensive Disorder Complicating Pregnancy. *Indian J Pharm Sci*. 2022;84(S2).

188. Luo S, Wang L, Li S, Wang H, Huang S, Zhang Z, et al. Identification of Key Molecules and lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA Network in Preeclampsia. *Int J Gen Med*. 2021 Nov;Volume 14:7579–90.
189. Cai H, Li D, Wu J, Shi C. miR-519d downregulates LEP expression to inhibit preeclampsia development. *Open Medicine*. 2021 Aug 25;16(1):1215–27.
190. Wu M, Zhao Y, Li L, Wang G, Xing L. Exosomal microRNA 302a promotes trophoblast migration and proliferation, and represses angiogenesis by regulating the expression levels of VEGFA in preeclampsia. *Mol Med Rep*. 2021 Oct 19;24(6):864.
191. Mao Q, Zou H. Circular RNA circ_0032962 promotes trophoblast cell progression as ceRNA to target PBX3 via sponging miR-326 in preeclampsia. *Reprod Biol*. 2021 Dec;21(4):100571.
192. Jin M, Xu S, Li J, Yao Y, Tang C. MicroRNA-3935 promotes human trophoblast cell epithelial-mesenchymal transition through tumor necrosis factor receptor-associated factor 6/regulator of G protein signaling 2 axis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021 Dec 7;19(1):134.
193. Dong N, Li D, Cai H, Shi L, Huang L. Expression of lncRNA MIR193BHG in serum of preeclampsia patients and its clinical significance. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2022 May;51(5):102357.
194. Li Y, Chen J, Song S. Circ-OPHN1 suppresses the proliferation, migration, and invasion of trophoblast cells through mediating miR-558/THBS2 axis. *Drug Dev Res*. 2022 Jun 11;83(4):1034–46.
195. Li H, Zhou L, Zhang C, Xi Q, Lv J, Huo W, et al. Follistatin dysregulation impaired trophoblast biological functions by GDF11-Smad2/3 axis in preeclampsia placentas. *Placenta*. 2022 Apr;121:145–54.
196. Wang W, Shi J, Zheng L. Identification of Circular RNA circ_0017068 as a Regulator of Proliferation and Apoptosis in Trophoblast Cells by miR-330-5p/XIAP Axis. *Reproductive Sciences*. 2022 Aug 3;29(8):2414–27.
197. Zhang Z, Wang Y. Over-expression of long non-coding RNA NORAD promotes trophoblastic cell viability, migration, and invasion in preeclampsia via the miR-202-5p/FXR1 axis. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2022 Mar;61(2):255–64.

198. Xing H, Ding Q, Lu H, Li Q. Circ_0007611 stimulates IL-1 receptor accessory protein to inhibit trophoblast cell proliferation and induce cell apoptosis. *Biol Reprod*. 2022 May 17;106(5):1011–21.
199. Liu J, Yang Y, Liu W, Lan R. circ_0085296 inhibits the biological functions of trophoblast cells to promote the progression of preeclampsia via the miR-942-5p/THBS2 network. *Open Medicine*. 2022 Mar 21;17(1):577–88.
200. Liu Y, Ma X, Liu Y. Hsa_circ_0001326 regulates proliferation, migration, invasion, and EMT of HTR-8/SVneo cells via increasing IL16 expression. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2021 Nov 22;86(5).
201. Yuan Y, Gong Y, Zhong L, Ding X, Yang Z, Su X, et al. Circular RNA expression profile and competing endogenous RNA regulatory network in preeclampsia. *Placenta*. 2022 Mar;119:32–8.
202. Wang W, Liu J, Pan E. CircHIPK3 contributes to human villous trophoblast growth, migration and invasion via modulating the pathway of miR-346/KCMF1. *Placenta*. 2022 Feb;118:46–54.
203. Li C, Li Q. Circular RNA circ_0111277 Serves as ceRNA, Targeting the miR-424-5p/NFAT5 Axis to Regulate the Proliferation, Migration, and Invasion of Trophoblast Cells in Preeclampsia. *Reproductive Sciences*. 2022 Mar 30;29(3):923–35.
204. Wei X, Yuan Y, Yang Q. SNHG22 promotes migration and invasion of trophoblasts via miR-128-3p/PCDH11X axis and activates PI3K/Akt signaling pathway. *Clinics*. 2022 Jan;77:100055.
205. Zou Y, Jiang Z, Yu X, Zhang Y, Sun M, Wang W, et al. MiR-101 regulates apoptosis of trophoblast HTR-8/SVneo cells by targeting endoplasmic reticulum (ER) protein 44 during preeclampsia. *J Hum Hypertens*. 2014 Oct 1;28(10):610–6.
206. Wang Y, Cheng K, Zhou W, Liu H, Yang T, Hou P, et al. miR-141-5p regulate ATF2 via effecting MAPK1/ERK2 signaling to promote preeclampsia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019 Jul;115:108953.
207. Yang Y, Li H, Ma Y, Zhu X, Zhang S, Li J. MiR-221-3p is down-regulated in preeclampsia and affects trophoblast growth, invasion and migration partly via targeting thrombospondin 2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019 Jan;109:127–34.

208. Yang Y, Xi L, Ma Y, Zhu X, Chen R, Luan L, et al. The lncRNA small nucleolar RNA host gene 5 regulates trophoblast cell proliferation, invasion, and migration via modulating miR-26a-5p/N-cadherin axis. *J Cell Biochem.* 2019 Mar 22;120(3):3173–84.
209. Huang J, Zheng L, Kong H, Wang F, Su Y, Xin H. miR-139-5p promotes the proliferation and invasion of trophoblast cells by targeting sFlt-1 in preeclampsia. *Placenta.* 2020 Mar;92:37–43.
210. Li HQ, Fan JJ, Li XH, Bao D. MiR-507 inhibits the growth and invasion of trophoblasts by targeting CAMK4. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020 Jun;24(11):5856–62.
211. Wu D, Shi L, Hong L, Chen X, Cen H. MiR-135a-5p promotes the migration and invasion of trophoblast cells in preeclampsia by targeting β -TrCP. *Placenta.* 2020 Sep;99:63–9.
212. Yu Z, Zhang Y, Zheng H, Gao Q, Wang H. LncRNA SNHG16 regulates trophoblast functions by the miR-218-5p/LASP1 axis. *J Mol Histol.* 2021 Oct 10;52(5):1021–33.
213. Tang Q, Gui J, Wu X, Wu W. Downregulation of miR-424 in placenta is associated with severe preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2019 Jul;17:109–12.
214. Su S, Zhong L, Huang S, Deng L, Pang L. MiRNA-494 induces trophoblast senescence by targeting SIRT1. *Hypertens Pregnancy.* 2023 Dec 31;42(1).
215. Li Z, Ru X, Wang S, Cao G. miR-24-3p regulation of retinol binding protein 4 in trophoblast biofunction and preeclampsia. *Mol Reprod Dev.* 2022 Sep 12;89(9):423–30.
216. Gu F, Lu D, Zhang L. MicroRNA-30a contributes to pre-eclampsia through regulating the proliferation, apoptosis, and angiogenesis modulation potential of mesenchymal stem cells by targeting AVEN. *Bioengineered.* 2022 Apr 1;13(4):8724–34.
217. MO W, JIN J, WANG X, LUAN W, YAN J, LONG X. MicroRNA-206 Contributes to the Progression of Preeclampsia by Suppressing the Viability and Mobility of Trophocytes via the Inhibition of AGTR1. *Physiol Res.* 2023 Nov 20;72(5):597–606.
218. Li K, Lv C, Zhang W, Fang J. CircFN1 upregulation initiated oxidative stress-induced apoptosis and inhibition of proliferation and migration in trophoblasts via circFN1-miR-19a/b-3p-ATF2 ceRNA network. *Reprod Biol.* 2022 Jun;22(2):100631.
219. PENG X, ZHANG R, ZHANG Y, CAI C. Nuclear Factor-Kappa B-induced miRNA-518a-5p represses trophoblast cell migration and invasion by the Nuclear Factor-Kappa B pathway. *An Acad Bras Cienc.* 2023;95(1).

220. Li C, Li Q. Circular RNA circ_0111277 Serves as ceRNA, Targeting the miR-424-5p/NFAT5 Axis to Regulate the Proliferation, Migration, and Invasion of Trophoblast Cells in Preeclampsia. *Reproductive Sciences*. 2022 Mar 30;29(3):923–35.
221. Shang J, Lin L, Huang X, Zhou L, Huang Q. Re-expression of circ_0043610 contributes to trophoblast dysfunction through the miR-558/RYBP pathway in preeclampsia. *Endocr J*. 2022;69(12):EJ22-0153.
222. Cao C, Cui J, Liu G. circ_0004904 regulates the trophoblast cell in preeclampsia via miR-19b-3p/ARRDC3 axis. *Open Medicine*. 2023 May 16;18(1).
223. Zhu W, Chen X. miR 424 5p is downregulated in the placentas of patients with preeclampsia and affects trophoblast migration and invasion. *Exp Ther Med*. 2023 May 5;25(6):294.
224. Hu M, Zheng Y, Liao J, Wen L, Cheng J, Huang J, et al. miR21 modulates the Hippo signaling pathway via interference with PP2A B β to inhibit trophoblast invasion and cause preeclampsia. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022 Dec;30:143–61.
225. Xu X, Teng H. circRNA circ_0055724 Inhibits Trophoblastic Cell Line HTR-8/SVneo's Invasive and Migratory Abilities via the miR-136/N-Cadherin Axis. *Dis Markers*. 2022 Jun 22;2022:1–13.
226. Tian X, Zhang Y, Zhao M, Yin X. Circ_0030042 inhibits trophoblast cell growth, invasion and epithelial-mesenchymal transition process in preeclampsia via miR-942-5p/LITAF. *J Reprod Immunol*. 2024 Mar;162:104205.
227. Zhou M, Yu X, Li C, Lou L, Yang S, Cai J, et al. Circ_0111277 suppresses trophoblast cell proliferation, angiogenesis, migration, invasion and EMT via regulating miR-188-3p/GRHL2 axis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2023 Mar 29;89(3).
228. Xu J, Wang J, Chen M, Chao B, He J, Bai Y, et al. miR-101-5p suppresses trophoblast cell migration and invasion via modulating the DUSP6-ERK1/2 axis in preeclampsia. *J Assist Reprod Genet*. 2023 Jul 10;40(7):1597–610.
229. Zhou D, Qu B, Zhang X. Diagnostic value of serum miR-25-3p in hypertensive disorders in pregnancy. *Women Health*. 2022 Nov 26;62(9–10):818–26.
230. Liu H, Wang X. MiR-200b-3p is upregulated in the placental tissues from patients with preeclampsia and promotes the development of preeclampsia via targeting profilin 2. *Cell Cycle*. 2022 Sep 17;21(18):1945–57.

231. Liao W, Zeng H, Jiang X, Deng X, Tu S, Lan H, et al. CircPAPPA2 plays a role in preeclampsia pathogenesis via regulation of the miR-942/miR-5006-3p. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2024 Jun 7;24(1):414.
232. Zhou D, Xu X, Liu Y, Liu H, Cheng X, Gu Y, et al. *miR-195-5p facilitates the proliferation, migration, and invasion of human trophoblast cells by targeting FGF2*. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2022 Aug 18;48(8):2122–33.
233. Chen C, Gao J, Chen D, Liu J, He B, Chen Y, et al. miR-4443/MMP2 suppresses the migration and invasion of trophoblasts through the HB-EGF/EGFR pathway in preeclampsia. *Cell Cycle*. 2022 Dec 2;21(23):2517–32.
234. Zhu D, Guo T, Xu J, Yuan D, Lin M, Yang M. Elevated Expression of miR-296 in Human Placentas and Serum Samples From Pregnancies With Preeclampsia. *Br J Biomed Sci*. 2023 Apr 11;80.
235. LIN L, LIAN X, LIU Y, LIN A. MicroRNA-574-5p affects trophoblast proliferation, migration and invasion by targeting ZEB1 in preeclampsia. *Panminerva Med*. 2022 Oct;64(3).
236. Sui S, Zhang Y, Huang Y. microRNA-378a-3p plays a regulatory role in trophoblast cell function in preeclampsia by targeting CMTM3. *Mol Cell Endocrinol*. 2023 Oct;576:111997.
237. Lu C, Zheng F, Pan L, Han Q, Wu J, Zhang W. Suppression of circular *RNA* serum and glucocorticoid-induced kinase 1 elevates antioxidant molecules and angiogenesis in trophoblast cells to attenuate preeclampsia via *microRNA-508-3p* to target and restrain *PUM* homolog 1. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2024 Mar 11;50(3):322–33.
238. Wei X, Yuan Y, Yang Q. Long noncoding RNA PVT1 accelerates the growth of placental trophoblasts in preeclampsia through the microRNA-24-3p/HSD11B2 axis. *Mol Reprod Dev*. 2022 Jul 23;89(7):271–80.
239. Liu X, Li Z, Lu D. MicroRNA-223-3p downregulates the inflammatory response in preeclampsia placenta via targeting NLRP3. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2024 Mar 6;24(1):175.
240. Jiang L ling, Yang D lin, Han Q, Zhang H le, Pan M, Yan J ying. LncRNA-NEAT1 blocks the Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting miR-217 to inhibit trophoblast cell migration and invasion. *J Assist Reprod Genet*. 2024 Aug 6;41(8):2107–15.

241. Singh K, Williams J, Brown J, Wang ET, Lee B, Gonzalez TL, et al. Up-regulation of microRNA-202-3p in first trimester placenta of pregnancies destined to develop severe preeclampsia, a pilot study. *Pregnancy Hypertens.* 2017 Oct;10:7–9.
242. Anton L, Olarerin-George AO, Hogenesch JB, Elovitz MA. Placental Expression of miR-517a/b and miR-517c Contributes to Trophoblast Dysfunction and Preeclampsia. *PLoS One.* 2015 Mar 23;10(3):e0122707.
243. Anton L, Olarerin-George AO, Schwartz N, Srinivas S, Bastek J, Hogenesch JB, et al. miR-210 Inhibits Trophoblast Invasion and Is a Serum Biomarker for Preeclampsia. *Am J Pathol.* 2013 Nov;183(5):1437–45.
244. Kumar P, Luo Y, Tudela C, Alexander JM, Mendelson CR. The c-Myc-Regulated MicroRNA-17~92 (miR-17~92) and miR-106a~363 Clusters Target hCYP19A1 and hGCM1 To Inhibit Human Trophoblast Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2013 May 1;33(9):1782–96.
245. Zhang M, Muralimanoharan S, Wortman AC, Mendelson CR. Primate-specific miR-515 family members inhibit key genes in human trophoblast differentiation and are upregulated in preeclampsia. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016 Nov 8;113(45).
246. Brooks SA, Martin E, Smeester L, Grace MR, Boggess K, Fry RC. miRNAs as common regulators of the transforming growth factor (TGF)- β pathway in the preeclamptic placenta and cadmium-treated trophoblasts: Links between the environment, the epigenome and preeclampsia. *Food and Chemical Toxicology.* 2016 Dec;98:50–7.
247. Hocaoglu M, Demirer S, Senturk H, Turgut A, Komurcu-Bayrak E. Differential expression of candidate circulating microRNAs in maternal blood leukocytes of the patients with preeclampsia and gestational diabetes mellitus. *Pregnancy Hypertens.* 2019 Jul;17:5–11.
248. Hromadnikova I, Kotlabova K, Hymanova L, Krofta L. Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood. *Thromb Res.* 2016 Jan;137:126–40.
249. Hromadnikova I, Kotlabova K, Hymanova L, Krofta L. Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Associated microRNAs Are Dysregulated in Placental Tissues Affected with Gestational Hypertension, Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *PLoS One.* 2015 Sep 22;10(9):e0138383.
250. Hromadnikova I, Kotlabova K, Ondrackova M, Pirkova P, Kestlerova A, Novotna V, et al. Expression Profile of C19MC microRNAs in Placental Tissue in Pregnancy-Related Complications. *DNA Cell Biol.* 2015 Jun;34(6):437–57.

251. Hromadnikova I, Kotlabova K, Ondrackova M, Kestlerova A, Novotna V, Hympanova L, et al. Circulating C19MC MicroRNAs in Preeclampsia, Gestational Hypertension, and Fetal Growth Restriction. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:1–12.
252. Akehurst C, Small HY, Sharafetdinova L, Forrest R, Beattie W, Brown CE, et al. Differential expression of microRNA-206 and its target genes in preeclampsia. *J Hypertens.* 2015 Oct;33(10):2068–74.
253. Leseva MN, Binder AM, Ponsonby AL, Vuillermin P, Saffery R, Michels KB. Differential gene expression and limited epigenetic dysregulation at the materno-fetal interface in preeclampsia. *Hum Mol Genet.* 2020 Jan 15;29(2):335–50.
254. Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Herrmann J, Groten T, Schleussner E, Markert UR, et al. MicroRNA-141 is upregulated in preeclamptic placentae and regulates trophoblast invasion and intercellular communication. *Translational Research.* 2016 Jun;172:61–72.
255. Sandrim V, Luizon M, Palei A, Tanus-Santos J, Cavalli R. Circulating microRNA expression profiles in pre-eclampsia: evidence of increased miR-885-5p levels. *BJOG.* 2016 Dec;123(13):2120–8.
256. Campos CB, Marques TM, Pereira RW, Sandrim VC. Reduced circulating miR-196b levels is associated with preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health.* 2014 Jan;4(1):11–3.
257. Sandrim VC, Diniz S, Eleuterio NM, Gomes KB, Dusse LMS, Cavalli RC. Higher levels of circulating TIMP-4 in preeclampsia is strongly associated with clinical parameters and microRNA. *Clin Exp Hypertens.* 2018 Oct 3;40(7):609–12.
258. Kim S, Lee KS, Choi S, Kim J, Lee DK, Park M, et al. NF- κ B-responsive miRNA-31-5p elicits endothelial dysfunction associated with preeclampsia via down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry.* 2018 Dec;293(49):18989–9000.
259. Choi SY, Yun J, Lee OJ, Han HS, Yeo MK, Lee MA, et al. MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using a PNA-based microarray. *Placenta.* 2013 Sep;34(9):799–804.
260. Kim S, Park M, Kim JY, Kim T, Hwang J, Ha KS, et al. Circulating miRNAs Associated with Dysregulated Vascular and Trophoblast Function as Target-Based Diagnostic Biomarkers for Preeclampsia. *Cells.* 2020 Aug 31;9(9):2003.
261. Nejad RMA, Saeidi K, Gharbi S, Salari Z, Saleh-Gohari N. Quantification of circulating miR-517c-3p and miR-210-3p levels in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2019 Apr;16:75–8.

262. Azizi F, Saleh Gargari S, Asadi Shahmirzadi S, Dodange F, Amiri V, Mirfakhraie R, et al. Evaluation of Placental mir-155-5p and Long Non-coding RNA sONE Expression in Patients with Severe Pre-eclampsia. *Int J Mol Cell Med*. 2017;6(1):22–30.
263. Amin-Beidokhti M, Sadeghi H, Pirjani R, Gachkar L, Gholami M, Mirfakhraie R. Differential expression of <i>Hsa-miR-517a/b</i> in placental tissue may contribute to the pathogenesis of preeclampsia. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*. 2021 Dec 1;22(4):273–8.
264. Abbas MA, Abo Shady HM, Ahmed Elshafey OH, Al-Sheikh NM. Association between expression levels of p53, miRNA-21, and lncRNA-TCL6 and the risk of preeclampsia in pregnant women. *Gene*. 2024 Jan;893:147932.
265. Murphy MSQ, Casselman RC, Tayade C, Smith GN. Differential expression of plasma microRNA in preeclamptic patients at delivery and 1 year postpartum. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Sep;213(3):367.e1-367.e9.
266. Brkić J, Dunk C, O'Brien J, Fu G, Nadeem L, Wang Y ling, et al. MicroRNA-218-5p Promotes Endovascular Trophoblast Differentiation and Spiral Artery Remodeling. *Molecular Therapy*. 2018 Sep;26(9):2189–205.
267. Lázár L, Nagy B, Molvarec A, Szarka A, Rigó J. Role of hsa-miR-325 in the etiopathology of preeclampsia. *Mol Med Rep*. 2012 Sep;6(3):597–600.
268. Lázár L, Nagy B, Morvarec A, Rigó J. The Correlation of Circulating Cell-Free DNA, Cell-Free Fetal DNA and MicroRNA 325 Levels to Clinical Characteristics and Laboratory Parameters in Pre-eclampsia. In: *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. p. 153–6.
269. Martinez-Fierro ML, Carrillo-Arriaga JG, Luevano M, Lugo-Trampe A, Delgado-Enciso I, Rodriguez-Sanchez IP, et al. Serum levels of miR-628-3p and miR-628-5p during the early pregnancy are increased in women who subsequently develop preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2019 Apr;16:120–5.
270. Martinez-Fierro ML, Garza-Veloz I, Gutierrez-Arteaga C, Delgado-Enciso I, Barbosa-Cisneros OY, Flores-Morales V, et al. Circulating levels of specific members of chromosome 19 microRNA cluster are associated with preeclampsia development. *Arch Gynecol Obstet*. 2018 Feb 1;297(2):365–71.
271. Sekar D, Lakshmanan G, Mani P, Biruntha M. Methylation-dependent circulating microRNA 510 in preeclampsia patients. *Hypertension Research*. 2019 Oct 21;42(10):1647–8.

272. Sharma C, Purohit P, Khokhar M, Modi A, Singh P, Shekhar S, et al. A clinical and in-silico study exploring the association of CASP-3, NF-kB, miR-187, and miR-146 in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2021 Oct 2;40(4):288–302.
273. Kolkova Z, Holubekova V, Grendar M, Nachajova M, Zubor P, Pribulova T, et al. Association of Circulating miRNA Expression with Preeclampsia, Its Onset, and Severity. *Diagnostics*. 2021 Mar 8;11(3):476.
274. Nunode M, Hayashi M, Nagayasu Y, Sawada M, Nakamura M, Sano T, et al. miR-515-5p suppresses trophoblast cell invasion and proliferation through XIAP regulation in preeclampsia. *Mol Cell Endocrinol*. 2023 Jan;559:111779.
275. Tsai PY, Li SH, Chen WN, Tsai HL, Su MT. Differential miR-346 and miR-582-3p Expression in Association with Selected Maternal and Fetal Complications. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 19;18(7):1570.
276. Wang C, Tsai P, Chen T, Tsai H, Kuo P, Su M. Elevated miR-200a and miR-141 inhibit endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in preeclampsia. *J Physiol*. 2019 Jun 22;597(12):3069–83.
277. Doridot L, Houry D, Gaillard H, Chelbi ST, Barbaux S, Vaiman D. miR-34a expression, epigenetic regulation, and function in human placental diseases. *Epigenetics*. 2014 Jan 30;9(1):142–51.
278. Zhao G, Zhou X, Chen S, Miao H, Fan H, Wang Z, et al. Differential expression of microRNAs in decidua-derived mesenchymal stem cells from patients with pre-eclampsia. *J Biomed Sci*. 2014 Dec 19;21(1):81.
279. Ali Z, Zafar U, Tauseef A, Zaki S, Khaliq S. MICRO RNA 182-3-P, 519-D-5P, 378-3P AS NON-INVASIVE PREDICTORS OF PREECLAMPSIA. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*. 2023 Aug 10;35(3).

ARTIGO 2 - Early and late-onset preeclampsia: effects of *DDAH2* polymorphisms on ADMA levels and association with *DDAH2* haplotypes

MENDES, Fernanda Santos; LUIZON, Marcelo Rizzatti; LOPES, Ana Cristina dos Santos; PEREIRA, Daniela Alves; EVANGELISTA, Fernanda Cristina Gontijo; GODOI, Lara Carvalho; DUSSE, Luci Maria; ALPOIM, Patrícia Nessralla. Early and late-onset preeclampsia: effects of *DDAH2* polymorphisms on ADMA levels and association with *DDAH2* haplotypes. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 46, e-rbgo19, Mar. 2024. DOI: 10.61622/rbgo/2024AO19

Artigo publicado na Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Qualis B1) em 2024.

Early and late-onset preeclampsia: effects of DDAH2 polymorphisms on ADMA levels and association with DDAH2 haplotypes

Fernanda Santos Mendes¹

<https://orcid.org/0000-0001-7717-7398>

Marcelo Rizzatti Luizon¹

<https://orcid.org/0000-0002-8331-3525>

Ana Cristina dos Santos Lopes¹

<https://orcid.org/0000-0002-1111-7509>

Daniela Alves Pereira¹

<https://orcid.org/0000-0001-5491-6709>

Fernanda Cristina Gontijo Evangelista¹

<https://orcid.org/0000-0003-4682-397X>

Lara Carvalho Godoi¹

<https://orcid.org/0000-0003-3556-6701>

Luci Maria Dusse¹

<https://orcid.org/0000-0002-7484-1684>

Patrícia Nessler Alpoim¹

<https://orcid.org/0000-0002-3602-2645>

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Conflicts of interest: none to declare.

How to cite

Mendes FS, Luizon MR, Lopes AC, Pereira DA, Evangelista FC, Godoi LC, et al. Early and late-onset Preeclampsia: effects of DDAH2 polymorphisms on ADMA levels and association with DDAH2 haplotypes. Rev Bras Ginecol Obstet. 2024;46:e-rbgo19.

DOI

<http://dx.doi.org/10.61622/rbgo/2024A019>



Keywords

Pre-eclampsia; Asymmetric dimethylarginine; Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene; Nitric Oxide Synthase Type III/ genetics; Nitric Oxide Synthase; Haplotypes; Polymorphism, genetic; Pregnant women; Genotype

Submitted

March 29, 2023

Accepted

August 7, 2023

Corresponding author

Patrícia Nessler Alpoim
E-mail: patnessralla@yahoo.com.br

Associate Editor

Valéria Cristina Sandrim
(<https://orcid.org/0000-0002-6168-7470>)
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, Brasil

Abstract

Objective: To examine whether the *DDAH2* promoter polymorphisms -1415G/A (rs2272592), -1151A/C (rs805304) and -449G/C (rs805305), and their haplotypes, are associated with PE compared with normotensive pregnant women, and whether they affect ADMA levels in these groups.

Methods: A total of 208 pregnant women were included in the study and classified as early-onset (N=57) or late-onset PE (N =49), and as normotensive pregnant women (N = 102).

Results: Pregnant with early-onset PE carrying the GC and GG genotypes for the *DDAH2* -449G/C polymorphism had increased ADMA levels (P=0.01). No association of *DDAH2* polymorphisms with PE in single-locus analysis was found. However, the G-C-G haplotype was associated with the risk for late-onset PE.

Conclusion: It is suggested that *DDAH2* polymorphisms could affect ADMA levels in PE, and that *DDAH2* haplotypes may affect the risk for PE.

Introduction

Preeclampsia (PE) is characterized by hypertension after 20 weeks of gestation and other clinical criteria, which may include proteinuria.⁽¹⁾ PE is a multisystem disorder that targets the kidneys, liver, endothelium, brain, and coagulation processes, thereby leading to complications such as acute renal failure, hepatic rupture and cerebrovascular disease. Moreover, fetal complications can be observed in preeclamptic women, such as intrauterine growth restriction and preterm delivery.⁽²⁾ Therefore, PE is a major cause of maternal and/or perinatal morbidity and mortality.^(2,3) The pathogenesis of PE is related to placental disorders in early pregnancy, which is followed by the onset of generalized inflammation and progressive endothelial lesion. PE was proposed to be classified according to the onset of symptoms into early-onset (<34 weeks of gestation) and late-onset PE (≥34 weeks of gestation).⁽⁴⁾

Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by the NO synthases (NOS), and it acts as a potent vasodilator and an important regulator of vascular resistance.⁽⁵⁾ Diminished NO availability has been shown to be associated with pathophysiological mechanisms of PE.⁽⁶⁾ In this context, polymorphisms of the endothelial NOS (*NOS3*) gene were shown to affect nitrite concentrations (a marker of endogenous NO formation) in healthy subjects.⁽⁷⁾ Moreover, *NOS3* polymorphisms were found to be associated with essential hypertension⁽⁸⁾ and with hypertensive disorders in pregnancy,⁽⁹⁾ including with early and late severe PE.⁽¹⁰⁾ However, other parameters may affect NO levels beyond the genetic polymorphisms of *NOS3*.

Asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of NO synthesis, competes with L-arginine producing citrulline and dimethylamine. ADMA is formed by post-translational methylation, involving the addition of methyl groups to arginine residues by methyltransferases.⁽¹¹⁾ ADMA is released into the cytosol when these proteins with arginine residues are hydrolyzed, thereby being an obligatory product of protein turnover.^(11,12) Our group and others have reported higher ADMA levels in preeclampsia,^(13,14) and that circulating ADMA is elevated before the development of PE.⁽¹⁵⁾ Although the kidney plays an important role in the elimination of ADMA, its conversion by dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH 1 and 2) into citrulline and dimethylamine is the most important metabolic pathway.⁽¹¹⁾

DDAH2 is highly expressed in the placenta, whereas the protein turnover is increased in the developing fetoplacental unit.⁽¹⁶⁾ These findings suggest an important role of *DDAH2* in regulating the function of trophoblasts by their effect on NO production.⁽¹⁷⁾ Although the relationship among DDAH, increased ADMA levels and the impaired NO synthesis is already identified, the regulation of gene expression and DDAH activity remains unknown.^(16,18) In addition, no previous study has examined whether polymorphisms and

haplotypes of *DDAH2* gene affect ADMA levels or are associated with PE, including early-onset and late-onset PE.

In the present study, we examined whether the *DDAH2* polymorphisms -1415 G/A [rs2272592], -1151A/C [rs805304] and -449G/C [rs805305], and the haplotypes formed by them, are associated with early-onset or late-onset PE. Moreover, we examined whether genotypes for the *DDAH2* polymorphisms affect ADMA levels in normotensive pregnant women and in early-onset or late-onset PE.

Methods

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (ETIC 0530.0.203.000-09). Informed consent was obtained from all participants. This research was carried out according to the Declaration of Helsinki, as revised in 2008, without interference with medical recommendations or prescription.

This case-control study included 208 Brazilian pregnant women in the third trimester of gestation distributed in three groups: normotensive pregnant controls (NP, N = 102), early-onset PE (N = 57) and late-onset PE (N = 49). Preeclamptic women were selected at the time of hospital admission, while normotensive pregnant women were selected at a routine clinic visit, when the blood samples were collected.

The inclusion criteria for PE was defined by systolic blood pressure ≥ 160 mmHg or diastolic blood pressure ≥ 110 mmHg, at least in two occasions and four hours apart, after 20 weeks of gestation. Other clinical signs and symptoms were also considered, including cerebral or visual disturbances, progressive renal insufficiency and impaired. ⁽³⁾ Pregnant women with PE were grouped according to the gestational age on the onset of symptoms as early-onset (gestational age <34 weeks) and late-onset (gestational age ≥34 weeks).⁽⁴⁾ The normotensive pregnant group included healthy women with no history of PE or hypertension.

The common exclusion criteria for all groups were: chronic hypertension, diabetes mellitus, cancer, coagulation disorders, cardiovascular, autoimmune, hepatic, renal and inflammatory/infectious diseases. Clinical and laboratory data were obtained from medical records and interviews with the participants.

Maternal ADMA plasma levels were evaluated by ELISA (Diagnostika GmbH, Köln, Germany), as previously described.⁽¹⁹⁾

DNA was extracted and purified from whole blood, previously collected in EDTA, using Biopur Mini Spin Kit® (Biometrix, Brazil), according to the manufacturer's instructions. The DNA samples were stored at -80°C until the analysis.

The -1415G/A polymorphism [rs2272592] was assessed by real time polymerase chain reaction (RT-PCR) using TaqMan SNP Genotyping Assay C__3233670_1, in StepOne

Real-Time PCR equipment System [Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA]. In all PCR reactions, samples from previously genotyped subjects were included as controls. In addition, 10% of samples were re-genotyped in order to confirm the results.

The -1151A/C (rs805304) and -449G/C (rs805305) polymorphisms were genotyped by PCR followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis, using the following primers: 5'-CCGTTGCGCTGTTCTGAGGTCTAC-3' (sense), and 5'-CGGCTCCGGGCATTGTCTA-3' (antisense) for the -1151A/C polymorphism; 5'-CCTTCTCGTTCGGTATTGAG-3' (sense), and 5'-TCCAGACCTCCGCTCCT-3' (antisense) for the -449G/C polymorphism.

The final volume of PCR reaction mixture was 20 µL and contained 1 mM of each primer [Invitrogen®, São Paulo, Brazil], 0.2 mM deoxynucleoside triphosphate [Ludwig Biotec®, Alvorada, Brazil], 2.5 µL of 10X PCR Buffer and 0.5 units Taq polymerase [Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA]. The reactions were performed in a 2720 PCR thermocycler [Applied Biosystems®, California, USA] with initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles consisting of denaturation at 94°C for 40 seconds, 50 seconds at 71°C and 56°C for primer annealing of the -1151A/C and -449G/C polymorphisms, respectively, and extension at 72°C for 30 seconds.

The PCR products of -1151A/C and -449G/C were submitted to endonuclease digestion for 4 h at 37°C with the enzyme *MnI* [Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA] and for 3.5 h at 30°C with the enzyme *SmaI* [Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA], respectively, in a single reaction. Fragments were visualized on 8% polyacrylamide gel electrophoresis stained by silver nitrate.

Haplotype frequencies were estimated by using Haplo.stats package version 1.4.4 (<http://cran.r-project.org/web/packages/haplo.stats/index.html>), which computes maximum likelihood estimates of haplotypes and differences in haplotype frequencies using haplotype-specific scores to test for association.⁽¹⁹⁾ The possible haplotypes including the alleles for the *DDAH2* polymorphisms -1415G/A (rs2272592), -1151A/C (rs805304) and -449G/C (rs805305) were: G-C-C, G-A-G, A-A-G, G-C-G and G-A-C. The odds ratio and 95% confidence intervals were calculated for each haplotype. Only the haplotypes with frequencies >5% were taken into consideration in the analysis. A value of $P=0.01$ [0.05/5, the number of haplotypes] was considered significant to correct for the number of comparisons made [Bonferroni's correction]. Non-additive effects were selected to score haplotypes, and we have also considered dominant and recessive models.

Statistical analyses were performed with SPSS software [SPSS: An IBM Company, version 17.0, New York, USA] and STAT pages. Data normality was tested by Shapiro-Wilk test. Nonparametric variables (age, gestational age, body

mass index, weight gain, systolic and diastolic blood pressures) were compared by the Mann-Whitney test. Categorical variables (*DDH2* polymorphisms) were compared between groups by Pearson Chi-Square test. The distribution of genotypes for each polymorphism was assessed for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, and differences in genotype and allele frequencies between groups were assessed using χ^2 tests. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The clinical and demographic characteristics of the participants enrolled in this study are shown in table 1. There were no significant differences when comparing age and body mass index (BMI) among the normotensive and early-onset and late-onset PE groups ($P > 0.05$) [Table 1]. Weight gain during pregnancy was higher in women with late-onset PE when compared to normotensive pregnant controls ($p < 0.001$). As expected, systolic and diastolic blood pressure were significantly higher in early-onset and late-onset PE groups compared to normotensive pregnant women ($P < 0.001$), while gestational age differed among the groups ($P < 0.001$). Proteinuria was detected in both the PE groups, and normotensive pregnant women had negative results for the dipstick test [Table 1].

Table 1. Clinical and demographic characteristics of pregnant women enrolled in the study

Parameters	Normotensive pregnant (n = 102)	Early-onset PE (n = 57)	p-value*	Late-onset PE (n = 49)	p-value*
Age (years)	24.97 ± 0.61	26.79 ± 0.95	0.096	26.52 ± 0.97	0.167
GA (weeks)	32.80 ± 0.44	30.24 ± 0.36	0.001 ^a	36.24 ± 0.26	<0.001 ^{ab}
BMI (Kg/m ²)	24.27 ± 0.46	24.55 ± 0.74	0.742	24.46 ± 1.40	0.889
GWG (Kg)	10.51 ± 0.56	12.37 ± 0.94	0.080	15.22 ± 1.09	<0.001 ^a
SBP (mmHg)	108.0 ± 0.82	169.6 ± 2.28	<0.001 ^a	186.5 ± 16.75	<0.001 ^a
DBP (mmHg)	70.20 ± 0.70	108.4 ± 1.79	<0.001 ^a	124.0 ± 17.92	<0.001 ^a
24-h-Pr (µg/24h)	ND	3.44 ± 0.45		3.62 ± 0.68	

GA, gestational age (diagnosis/sample collection); BMI, body mass index; GWG, gestational weight gain; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; 24-h-Pr, proteinuria; ND, not determined (but, with negative dipstick test); PE, Preeclampsia. Values are the mean ± s.e.m. Significant P values are indicated as follows: a $P < 0.05$ vs. normotensive pregnant; b $P < 0.05$ vs. early-onset PE.

Genotypes and alleles distribution are presented in table 2. The distribution of genotypes for the *DDAH2* polymorphisms showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. No significant differences were found for alleles and genotypes frequencies when compared the early-onset or late-onset PE groups with the normotensive pregnant group [$P > 0.05$] [Table 2]. The genotype frequencies were also compared considering the allele carriers [Table 2].

We have previously reported ADMA values for 50 normotensive pregnant women and for 54 pregnant with PE,⁽¹³⁾ which were increased in early-onset PE [0.66 µmol/L [0.52–0.78]] compared to late-onset PE [0.47 µmol/L [0.42–0.60]] ($P = 0.001$) and to the normotensive pregnant group [0.48

Table 2. Genotype and allele frequencies for *DDAH2* polymorphisms in normotensive pregnant compared to both early-onset and late-onset PE

Genotype or allele	Normotensive pregnant (n = 204)	Early-onset PE (n = 124)	OR (95% CI)	p-value	Late-onset PE (n = 92)	OR (95% CI)	p-value
rs2272592 (-1415 G/A)							
GG	67 (81%)	43 (77%)	1.000 (Reference)	-	39 (93%)	1.000 (Reference)	-
GA	16 (19%)	13 (23%)	1.266 [0.554-2.892]	0.671	3 (7%)	0.322 [0.088-1.176]	0.112
AA	0 (0%)	0 (0%)	-	-	0 (0%)	-	-
G	150 (90%)	99 (88%)	1.000 (Reference)	-	81 (96%)	1.000 (Reference)	-
A	16 (10%)	13 (12%)	1.231 [0.567-2.672]	0.689	3 (4%)	0.347 [0.098-1.227]	0.127
rs805304 (-1151 C/A)							
CC	34 (34%)	23 (37%)	1.000 (Reference)	-	23 (50%)	1.000 (Reference)	-
CA	44 (45%)	32 (52%)	1.075 [0.534-2.161]	0.860	17 (37%)	0.571 [0.264-1.234]	0.176
AA	21 (21%)	7 (11%)	0.492 [0.180-1.348]	0.228	6 (13%)	0.422 [0.147-1.208]	0.141
CA+AA	65 (66%)	39 (63%)	0.887 [0.457-1.719]	0.737	23 (50%)	0.523 [0.256-1.066]	0.099
C	112 (57%)	78 (63%)	1.000 (Reference)	-	63 (68%)	1.000 (Reference)	-
A	86 (43%)	46 (37%)	0.768 [0.484-1.217]	0.295	29 (32%)	0.599 [0.355-1.010]	0.070
rs805305 (-449 C/G)							
CC	39 (38%)	22 (36%)	1.000 (Reference)	-	22 (49%)	1.000 (Reference)	-
CG	43 (42%)	29 (48%)	1.196 [0.591-2.416]	0.720	13 (29%)	0.535 [0.238-1.206]	0.158
GG	20 (10%)	10 (16%)	0.886 [0.352-2.228]	1.000	10 (22%)	0.886 [0.352-2.228]	1.000
CG+GG	63 (52%)	39 (64%)	1.097 [0.568-2.119]	0.867	23 (51%)	0.647 [0.318-1.314]	0.276
C	121 (59%)	73 (60%)	1.000 (Reference)	-	57 (63%)	1.000 (Reference)	-
G	83 (41%)	49 (40%)	0.978 [0.619-1.546]	1.000	33 (37%)	0.844 [0.505-1.408]	0.604

CI, Confidence Interval; OR, odds ratio; * P < 0.05 vs. normotensive pregnant group

$\mu\text{mol/L}$ [0.42–0.58]] [P=0.001].⁽¹³⁾ In the present study, we examined the effects of *DDAH2* genotypes on ADMA levels considering the normotensive control group and the pregnant women with early-onset and late-onset PE. We found no effects of *DDAH2* genotypes in the normotensive pregnant group. Moreover, we found no effects of genotypes for the -1151C/A and -1415G/A polymorphisms on ADMA levels in pregnant with PE [P>0.05] (Figure 1). However, pregnant women with early-onset PE carrying the GC and GG genotypes for the -449G/C polymorphism showed higher ADMA levels than those carrying the CC genotype [P=0.01] (Figure 1).

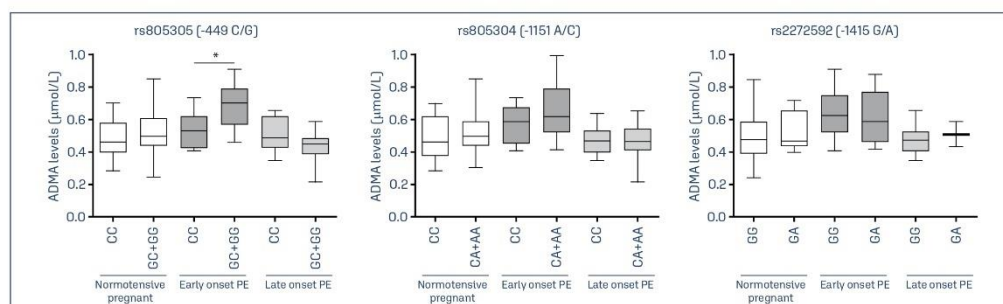
The distribution of *DDAH2* haplotypes is shown in table 3 and table 4. Notably, the G-C-G haplotype was more common in late-onset PE than in the normotensive group considering the additive model [P=0.003] (Table 3) and the dominant model [P=0.002] (Table 4). However, no

significant difference was found between early-onset PE and normotensive pregnant women in the additive model [P=0.064] (Table 3), or in the dominant model [P=0.018, after Bonferroni correction] (Table 4).

Discussion

The main novel findings reported in the present study were: [1] pregnant with early-onset PE carrying the GC and GG genotypes for the *DDAH2* -449G/C (rs805305) polymorphism showed increased ADMA levels; and [2] the haplotype G-C-G was found to be associated with the risk for late-onset PE.

Deficiency in *DDAH2* activity contributes to high ADMA levels, which compromises the NO synthesis.⁽²⁰⁾ Our group has found increased ADMA plasma levels in early-onset severe PE compared to late-onset severe PE.⁽¹³⁾ Since *DDAH2*



*P<0.05 vs. subjects with the CC genotype

Figure 1. ADMA levels in normotensive pregnant women and pregnant women with early-onset and late-onset PE grouped according to genotypes for the *DDAH2* polymorphisms -449G/C (rs805305), -1151A/C (rs805304), and -1415G/A (rs2272592). The box and whiskers plots show range and quartiles. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, with a line at the median. The whiskers show the highest and the lowest values

Table 3. Frequencies of haplotypes formed by alleles of the *DDAH2* SNPs -1415 G/A, -1151 C/A and -449 C/G in the normotensive pregnant and pregnant with early-onset PE and late-onset PE, considering the additive model

Haplotypes	Normotensive pregnant (N = 204)	Early-onset PE (n = 124)	P-values	OR (95% CI)	Late-onset PE (n = 92)	P-values	OR (95% CI)
G-C-C	0.5347	0.5098	0.893	1.000 (Reference)	0.5574	0.689	1.0000 (Reference)
G-A-G	0.3024	0.2843	0.541	0.9584 (0.5566-1.6502)	0.2055	0.126	0.7200 (0.3984-1.3014)
A-A-G	0.0837	0.0593	0.676	0.7937 (0.2605-2.4180)	0.0358	0.093	0.4267 (0.1159-1.5709)
G-C-G	0.0207	0.0632	0.064	2.7106 (0.7852-9.3563)	0.1274	0.003*	3.2856 (1.145-9.8864)
G-A-C	0.0417	0.0274	0.500	0.7102 (0.1907-2.6447)	0.0739	0.384	1.4223 (0.4754-4.2647)

*Global-stat = 5.85076, df = 6, P-val = 0.44011

Global-stat = 13.232, df = 5, P-val = 0.021297

DDAH2, Dimethylarginine Dimethylamine Hydrolase 2; CI, Confidence Interval; OR, odds ratio; * $P < 0.01$ (0.05/total number of possible haplotypes) was considered significant versus normotensive pregnant, to correct for the number of comparisons made (Bonferroni's correction)

Table 4. Frequencies of *DDAH2* haplotypes formed by alleles of -1415 G/A, -1151 C/A and -449 C/G polymorphisms in normotensive pregnant and in early and late-onset preeclampsia, considering the dominant model

Haplotypes	Normotensive Pregnant (n = 102)	Early-onset PE (n = 57)	P-value	Late-onset PE (n = 49)	P-value
G-C-C	0.5347	0.5098	0.700	0.5574	0.803
G-A-G	0.3024	0.2843	0.690	0.0358	0.067
A-A-G	0.0837	0.0593	0.704	0.2055	0.096
G-C-G	0.0207	0.0632	0.018	0.1274	0.002*
G-A-C	0.0417	0.0274	0.604	0.0739	0.244

*Global-stat = 8.61623, df = 6, P-val = 0.19634

Global-stat = 15.31869, df = 6, P-val = 0.01792

DDAH2, Dimethylarginine Dimethylamine Hydrolase 2; CI, Confidence Interval; OR, odds ratio; * $P < 0.01$ (0.05/total number of possible haplotypes) was considered significant versus normotensive pregnant, to correct for the number of comparisons made (Bonferroni's correction)

enzymes are directly involved in the catabolism of ADMA, it would be expected that *DDAH2* polymorphisms could be associated with PE. It is known that approximately 20% of ADMA is excreted in the urine, and that renal dysfunction is often observed in PE. Thus, it could be inferred that part of the plasma ADMA in preeclamptic women can be related to renal dysfunction. Moreover, it was shown that DDAH can be inactivated in the renal tubules by proteinuria, leading to ADMA accumulation.^[21] Oxidative stress, increased glucose and homocysteine plasma levels are other factors that may also contribute for the reduction of DDAH activity.^[22] Higher oxidative stress in preeclamptic women^[23] and higher homocysteine levels have already been described in mild and severe PE when compared to normotensive pregnant women.^[24]

Although no previous study has examined the effects of *DDAH2* polymorphisms on ADMA levels in PE, the C allele of the -1151C/A polymorphism was associated with the highest ADMA levels in subjects with type 2 diabetes,^[25] and in patients with chronic renal failure.^[16] Moreover, the G allele and GG genotype of -449C/G polymorphism were found to be associated with reduced *DDAH2* activity.^[26,27] Conversely, the AA genotype of -1151C/A polymorphism was associated with an increased prevalence of hypertension.^[28] In addition, the presence of at least one A allele was related to increased ADMA levels, and it was also associated with the development of cardiovascular disease.^[29] However, other study found no relationship between genotypes of *DDAH2* polymorphisms and ADMA levels and endothelium-dependent vasodilation or with flow-mediated dilatation measurement.^[30]

To our knowledge, no previous study has examined whether *DDAH2* haplotypes were associated with early-onset and late-onset PE. We have shown for the first time that the G-C-G haplotype may affect the risk of late-onset PE. The haplotype is composed by the combination of alleles for the -1415G/A, -1151C/A, and -449C/G polymorphisms, respectively. It is known that haplotypes may offer improved genetic information in association studies compared with the analysis of single genetic markers,^[31] and they can capture the combined effects of causal variants.^[32] However, these alleles could also be in linkage disequilibrium with other functional polymorphisms in the promoter region of *DDAH2* gene not included in this study. Regarding functional role, the -1151A/C (rs805304) polymorphism is likely to affect transcription factor binding according to its score 2c at RegulomeDB,^[33] which suggests that it may affect *DDAH2* transcription. The three *DDAH2* polymorphisms examined are considered expression Quantitative Trait Loci (eQTLs) for *DDAH2* expression in several tissues according to GTEx portal (<https://gtexportal.org/>),^[34] and the alternative alleles for each polymorphism was associated with decreased expression. In agreement with this functional evidence, we found here that ADMA levels were higher in pregnant women with early-onset PE carrying the GC+GG genotype than in carriers of the CC genotype for the rs805305 polymorphism. The GC and GG genotypes are associated with lower *DDAH2* expression, which could contribute to high ADMA levels.

The present has limitations. First, we have studied a relatively small number of preeclamptic women, and ADMA levels were determined in a smaller number of pregnant women. Despite this limitation, we have shown the effect of *DDAH2* genotypes on ADMA levels. Moreover, we found significant associations of *DDAH2* haplotypes with the risk of PE, and it is important to consider that the G-C-G is a common haplotype (>12% frequency in the late-onset PE group), thus highlighting its importance. Second, we have not measured placental or tissue ADMA levels and, therefore, its importance is not known at tissue level. In summary, although genetic polymorphisms may have clinical implications for PE risk, they are not established as the unique factors responsible for the disease, considering the multifactorial character of PE.

Conclusion

We found that genotypes for the *DDAH2* polymorphisms -1151C/A (rs805304) and -449G/C (rs805305) may affect ADMA levels in pregnant with PE, and the *DDAH2* haplotype G-C-G was found to be associated with the risk for late-onset PE.

Acknowledgments

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil, 00764-16) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil, 404353/2016-9). LMSD is grateful to CNPq Research fellowship.

Author's contributions

Mendes FS, Luizon MR, Lopes ACS, Pereira DA, Evangelista FCG, Godoi LC, Dusse LM, Alpoim PN contributed to the design of the study, were involved in the data collection, data analysis and/or interpretation. Also, all authors contributed to the writing/substantive editing and review of the manuscript and approved the final draft of the manuscript.

References

- Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013;122(5):1122-31. doi: 10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88
- Chaiworapongsa T, Chaemsathong P, Yeo L, Romero R. Preeclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(8):466-80. doi: 10.1038/nrneph.2014.102
- Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Preeclampsia. *Lancet.* 2016;387(10022):999-1011. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00070-7
- Kenny LC, Black MA, Poston L, Taylor R, Myers JE, Baker PN, et al. Early pregnancy prediction of preeclampsia in nulliparous women, combining clinical risk and biomarkers: the Screening for Pregnancy Endpoints (SCOPE) international cohort study. *Hypertension.* 2014;64(3):644-62. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03578
- Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 1):213-54. doi: 10.1007/3-540-32967-6_7
- Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin in preeclampsia. *Hypertension.* 2008;52(2):402-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.115006
- Metzger IF, Luizon MR, Lacchini R, Ishizawa MH, Tanus-Santos JE. Effects of endothelial nitric oxide synthase tagSNPs on nitrite levels in black subjects. *Nitric Oxide.* 2013;28:33-8. doi: 10.1016/j.niox.2012.10.002
- Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Luizon MR, Fontana V, Silva PS, Biagi C, et al. Endothelial nitric oxide synthase tagSNPs influence the effects of enalapril in essential hypertension. *Nitric Oxide.* 2016;55-56:62-9. doi: 10.1016/j.niox.2016.03.006
- Muniz L, Luizon MR, Palei AC, Lacchini R, Duarte G, Cavalli RC, et al. eNOS tag SNP haplotypes in hypertensive disorders of pregnancy. *DNA Cell Biol.* 2012;31(12):1665-70. doi: 10.1089/dna.2012.1768
- Alpoim PN, Gomes KB, Pinheiro MB, Godoi LC, Jardim LL, Muniz LG, et al. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. *Nitric Oxide.* 2014;42:19-23. doi: 10.1016/j.niox.2014.07.006
- Siroen MP, Teerlink T, Nijveldt RJ, Prins HA, Richir MC, van Leeuwen PA. The clinical significance of asymmetric dimethylarginine. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:203-28. doi: 10.1146/annurev.nutr.26.061505.111320
- Tain YL, Hsu CN. Toxic dimethylarginines: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and Symmetric dimethylarginine (SDMA). *Toxins (Basel).* 2017;9(3):92. doi: 10.3390/toxins9030092
- Alpoim PN, Godoi LC, Freitas LG, Gomes KB, Dusse LM. Assessment of L-arginine asymmetric 1 dimethyl (ADMA) in early-onset and late-onset (severe) preeclampsia. *Nitric Oxide.* 2013;33:81-2. doi: 10.1016/j.niox.2013.07.006
- Németh B, Murányi E, Hegyi P, Mátrai P, Szakács Z, Varjú P, et al. Asymmetric dimethylarginine levels in preeclampsia - systematic review and meta-analysis. *Placenta.* 2018;69:57-63. doi: 10.1016/j.placenta.2018.07.010
- Yuan J, Wang X, Xie Y, Wang Y, Dong L, Li H, et al. Circulating asymmetric dimethylarginine and the risk of preeclampsia: a meta-analysis based on 1338 participants. *Oncotarget.* 2017;8(27):43944-52. doi: 10.18632/oncotarget.16543
- Pope AJ, Karrupiah K, Kearns PN, Xia Y, Cardouel AJ. Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the regulation of endothelial nitric oxide production. *J Biol Chem.* 2009;284(51):35338-47. doi: 10.1074/jbc.M109.037036
- Ayling LJ, Whitley GS, Aplin JD, Cartwright JE. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) regulates trophoblast invasion and motility through effects on nitric oxide. *Hum Reprod.* 2006;21(10):2530-7. doi: 10.1093/humrep/del111
- Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(6):H3227-45. doi: 10.1152/ajpheart.00998.2007
- Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet.* 2002;70(2):425-34. doi: 10.1086/338688
- Murray-Rust J, Leiper J, McAllister M, Pheasant J, Tilley S, Santa Maria J, et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol.* 2001;8(8):679-83. doi: 10.1038/90387
- Ueda S, Yamagishi S, Okuda S. New pathways to renal damage: role of ADMA in retarding renal disease progression. *J Nephrol.* 2010;23(4):377-86.
- Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2001;104(21):2569-75. doi: 10.1161/hc4601.098514
- Daglar K, Kirbas A, Timur H, Ozturk Inal Z, Danisman N. Placental levels of total oxidative and anti-oxidative status, ADAMTS-12 and decorin in early- and late-onset severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(24):4059-64. doi: 10.3109/14767058.2016.1154942
- Zeng Y, Li M, Chen Y, Wang S. Homocysteine, endothelin-1 and nitric oxide in patients with hypertensive disorders complicating pregnancy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(11):15275-9.
- Marra M, Marchegiani F, Ceriello A, Sirolla C, Boemi M, Franceschi C, et al. Chronic renal impairment and DDAH2-1151 A/C polymorphism determine ADMA levels in type 2 diabetic subjects. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(4):964-71. doi: 10.1093/ndt/gfs516
- Lambden S, Tomlinson J, Piper S, Gordon AC, Leiper J. Evidence for a protective role for the rs805305 single nucleotide polymorphism of dimethylarginine septic shock through the regulation of DDAH activity. *Critical Care.* 2018;22(1):336. doi: 10.1186/s13054-018-2277-5
- Wang T, Zhang Y, Niu K, Wang L, Shi Y, Liu B. Association of the -449G/C and -1151A/C polymorphisms in the *DDAH2* gene with asymmetric dimethylarginine and erythropoietin resistance in Chinese patients on maintenance hemodialysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(9):961-4. doi: 10.1111/1440-1681.12793
- Maas R, Erdmann J, Lüneburg N, Stritzke J, Schwedhelm E, Meisinger C, et al. Polymorphisms in the promoter region of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of hypertension. *Pharmacol Res.* 2009;60(6):488-93. doi: 10.1016/j.phrs.2009.07.013
- Gad MZ, Hassanein SI, Abdel-Maksoud SM, Shaban GM, Abou-Aisha K. Association of *DDAH2* gene polymorphism with cardiovascular disease in Egyptian patients. *J Genet.* 2011;90(1):161-3. doi: 10.1007/s12041-011-0043-4
- Lind L, Ingelsson E, Kumar J, Syvanen AC, Axelsson T, Teerlink T. Genetic variation in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 gene (*DDAH1*) is related to asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels, but not to endothelium-dependent vasodilation. *Vasc Med.* 2013;18(4):192-9. doi: 10.1177/1359686313496488
- Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med.* 2005;56:303-20. doi: 10.1146/annurev.med.56.082103.104540
- Clark AG. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol.* 2004;27(4):321-33. doi: 10.1002/gepi.20025
- Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 2012;22(9):1790-7. doi: 10.1101/gr.137323.112
- GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet.* 2013;45(6):580-5. doi: 10.1038/ng.2653

ARTIGO 3 - Association among *ACE*, *ESR1* polymorphisms and preeclampsia in Brazilian pregnant women

LOPES, Ana Cristina dos Santos; PERUCCI Luiza Oliveira, EVANGELISTA, Fernanda Cristina Gontijo; GODOI, Lara Carvalho; SABINO, Adriano de Paula; GOMES, Karina Braga; TALVANI, André; DUSSE, Luci Maria S.; ALPOIM, Patrícia Nessralla. Association among *ACE*, *ESR1* polymorphisms and preeclampsia in Brazilian pregnant women. *Molecular and cellular probes*, v. 45, p. 43-47, 2019. DOI: 10.1016/j.mcp.2019.04.004

Artigo publicado na revista *Molecular and Cellular Probes* (Qualis B2) em 2019.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Probes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymcpr

Association among *ACE*, *ESR1* polymorphisms and preeclampsia in Brazilian pregnant women



Ana Cristina dos Santos Lopes^a, Luiza Oliveira Perucci^b, Fernanda Cristina Gontijo Evangelista^a, Lara Carvalho Godoi^a, Adriano de Paula Sabino^a, Karina Braga Gomes^a, André Talvani^c, Luci Maria S. Dusse^{a,*}, Patrícia Nessler Alpoim^a

^a Department of Clinical and Toxicological Analyses – Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Nucleus of Research in Biological Sciences, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

^c Department of Biological Sciences – Institute of Exact and Biological Sciences, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Preeclampsia
ACE gene
ESR1 gene
Polymorphism
Hypertension
Pregnant women

ABSTRACT

Background: Genetic, immune and environmental factors are involved in preeclampsia (PE) etiopathogenesis. Considering that hypertension and poor placental perfusion are important features in PE, polymorphisms in the *angiotensin-converting enzyme (ACE)* and *estrogen nuclear receptor 1 (ESR1)* genes could be involved in the predisposition and/or development of the disease. The aim of this study was to evaluate if polymorphisms in *ACE* and *ESR1* genes were associated with PE occurrence.

Material and Methods: This case-control study included 209 Brazilian pregnant women (107 with severe PE and 102 normotensive controls). The polymorphisms were investigated by polymerase chain reaction (PCR) followed by polyacrylamide gel electrophoresis.

Results: No significant difference between PE versus normotensive pregnant women, as well as early versus late PE, was observed when compared the allelic and genotypic frequencies of insertion/deletion polymorphism in intron 16 of the *ACE* gene and the single nucleotide polymorphisms (SNPs - rs2234693 and rs9340799) of the *ESR1* gene.

Conclusion: This pioneer study involving Brazilian women showed no association among the studied polymorphisms and PE, which suggests that ins/del *ACE* and SNPs *ESR1* do not contribute to this disease occurrence in Brazil.

1. Introduction

Preeclampsia (PE) is characterized by the onset of hypertension (> 140 mmHg systolic or > 90 mmHg diastolic) on or after 20 weeks gestation in association or not with proteinuria. Evidences of multi-system impairment, such as renal, liver and neurological dysfunctions can also be present [1]. This disease affects 2–8% of pregnancies worldwide and it is responsible for high maternal and perinatal morbidity and mortality rates [2,3]. PE is traditionally classified according to the blood pressure levels in mild or severe and, more recently, by the onset-time of clinical symptoms, such as early (< 34 weeks) or late PE (≥ 34 weeks) [4–6]. It has been admitted that early and late PE have different etiopathogenesis. Indeed, abnormal placentation and maternal complications are more common in early PE, while late PE is usually less severe and associated with pre-existing maternal conditions, as

diabetes mellitus [5,6]. Although PE etiopathogenesis is still unclear, it is a consensus that the placenta plays a key role and that the disease is multifactorial, i.e. caused by a combination of genetic, immunological and environmental factors [7]. Since different genes are associated with the onset and progression of PE, several studies have evaluated the relationship among different polymorphisms and pathogenic mechanisms of the disease. However, the genetic predisposition to PE and its complications remain inconclusive [8].

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays a pivotal role in blood pressure regulation through a series of enzymatic reactions. Angiotensinogen (Agt) is converted to angiotensin (Ang) 1 by renin catalysis, and angiotensin-converting enzyme (ACE) mediates the conversion of Ang 1 to Ang 2 [9]. Circulating and intrarenal RAAS are activated during normal pregnancy to control the salt-water balance and, hence, maternal blood pressure in order to maintain an adequate

* Corresponding author. Professor Luci Dusse Faculty of Pharmacy (room 4104 – B3), Universidade Federal de Minas Gerais 6627, Antônio Carlos Ave, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

E-mail addresses: lucidusse@gmail.com, lucim@farmacia.ufmg.br (L.M.S. Dusse).

<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.04.004>

Received 10 February 2019; Received in revised form 25 March 2019; Accepted 22 April 2019

Available online 24 April 2019

0890-8508/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

placental perfusion for the well-being of the mother and fetus [10]. Evidences suggest that the insertion (I) or deletion (D) of a 287-bp fragment in intron 16 of the *ACE* gene influence the expression and activity of the coded enzyme [11,12].

Estrogens exert their role through binding to a membrane-associated G-protein (GPR30 or GPER) or to nuclear receptors (ESR α or ESR1, and ESR β or ESR2). When estrogens activate GPR30, rapid non-genomic effects are triggered, but once they bind to nuclear receptors, they exert long-term effects by regulating the transcription of different genes. Evidences suggest that abnormal signaling of estrogen receptors play a role not only in reproductive disorders, but also in cardiovascular and a number of other diseases [13,14]. Indeed, polymorphisms in the *estrogen receptor (ESR1)* gene have been associated with blood pressure variations [15]. The most frequently studied polymorphisms of the *ESR1* gene are located in the first intron (c.454 –397T > C: PvuII restriction site [rs2234693] and c.454 –351A > G: XbaI restriction site [rs9340799]) [16,17], which may affect the expression and function of this nuclear receptor [18].

Considering that hypertension and poor placental perfusion are important features in PE, polymorphisms in the *ACE* and *ESR1* genes could be involved in the predisposition and/or development of the disease. Previous studies have investigated these polymorphisms in PE women, but their results are conflicting [17–21]. Therefore, the goal of this study was to evaluate the frequency of polymorphisms in the *ACE* (ins/del in intron 16) and *ESR1* (rs2234693 and rs9340799) genes in preeclamptic women and normotensive pregnant from the Southeastern State (Minas Gerais) of Brazil.

2. Material and methods

2.1. Study population

This case-control study included 209 Brazilian pregnant women (107 with severe PE and 102 normotensive controls) who were selected at Maternidade Odete Valadares-Belo Horizonte and Hospital Público Regional de Betim (Betim/Brazil), between 2008 and 2011. All women provided an informed written consent and ethics approvals were obtained from the Federal University of Minas Gerais (0530.0.203.000–09) and the public health institutions involved. The clinical data were obtained from medical records and interview during recruitment.

PE severe form was defined by systolic blood pressure \geq 160 mmHg, or diastolic blood pressure \geq 110 mmHg on two occasions at least 4 h apart, and if any of these findings were present: proteinuria; thrombocytopenia; impaired liver function; progressive renal insufficiency; pulmonary edema; new-onset cerebral or visual disturbances [1]. Severe PE women were stratified as early PE (N = 57) or late PE (N = 50) according to the onset-time of clinical symptoms [6]. Normotensive pregnant women had systolic/diastolic blood pressures \leq 120/80 mmHg and no history of hypertension and proteinuria. Exclusion criteria common to the two groups were: previous hypertension, hemostatic abnormalities, cancer, twin pregnancy, diabetes, cardiovascular, autoimmune, renal and hepatic diseases.

2.2. Blood sampling and processing

Genomic DNA was extracted from the whole peripheral blood sample (5 mL) using Biopur Mini Spin Kit[®] (Biometrix, Brazil), according to the manufacturer's instructions.

2.3. *ACE* gene polymorphism analysis

ACE I/D polymorphism was investigated by single polymerase chain reaction (PCR). The forward primer 5'-GCCCTGCAGGTGCTGCAGCA TGT-3' and the reverse primer 5'-GGATGGCTCTCCCCCTTGTCTC-3' were used to amplify the alleles D and I, resulting in amplicons of

319 bp and 597 bp, respectively. The fragments were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and subsequent staining with silver [44].

2.4. *ESR1* polymorphisms analyses

The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *ESR1* gene were evaluated by PCR-RFLP using the restriction enzymes PvuII for the rs2234693 polymorphism, and XbaI for the rs9340799 polymorphism [17].

For the rs2234693 polymorphism, the following primers were used: 5'-CAGGGTTATGTGGCAATGAC-3' (forward), and 5'-TACCTATAAAAA TGACAAAATGAAAT-3' (reverse). In the polyacrylamide electrophoresis gel, after the restriction enzyme treatment, the TT genotype was visualized as a single 255bp fragment; the TC genotype as three fragments of 97bp, 158bp and 255bp; and the CC genotype was visualized as two fragments of 97bp and 158bp.

The rs9340799 polymorphism was investigated with the primer forward 5'-CAGGGTTATGTGGCAATGAC-3', and the reverse 5'-TACCT ATAAAAATGACAAAATGAAAT-3'. In the polyacrylamide electrophoresis gel, the AA genotype was visualized as two fragments of 113 bp and 142bp; the AG genotype as three fragments of 113 bp, 142bp and 255bp; and the GG genotype was visualized as a fragment of 255bp after enzyme treatment.

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Genepop on the Web software (<http://genepop.curtin.edu.au/>) and SPSS software version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data normality was tested by Shapiro–Wilk test. The clinical characteristics (nonparametric variables) were compared by Mann–Whitney test. The distribution of genotypes for each polymorphism was assessed for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium, and differences in genotypic and allelic frequencies between the PE and normotensive groups were assessed by Pearson chi-square test. P values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical characteristics

The clinical characteristics of the two groups of pregnant women are shown in Table 1. Proteinuria was only determined in the preeclamptic group, and the median value for this parameter was 2.88g/24h (Interquartile range - IQ = 3.94).

3.2. Polymorphisms

The distribution of alleles in the PE group showed no deviation from Hardy–Weinberg equilibrium for the *ESR1*/rs2234693/rs9340799

Table 1
Clinical characteristics of PE and normotensive pregnant's groups.

Characteristics	PE pregnant (N = 107)	Normotensive pregnant (N = 102)	P
Age (years)	26 (11)	24 (10)	0.129
GA (weeks)	33 (5)	33 (7)	0.921
GWG (Kg)	13 (8)	10 (7)	0.003*
SBP (mmHg)	170 (20)	110 (15)	< 0.001*
DBP (mmHg)	110 (15)	70 (0)	< 0.001*

Abbreviations: GA, gestational age (sample collection); GWG, gestational weight gain; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure. Data are presented as median (interquartile range). *P < 0.05 (Mann–Whitney test).

Table 2
Genotypic and allelic frequencies of *ACE* and *ESR1* genes polymorphisms in PE and normotensive pregnant's groups.

ACE polymorphism			
	PE pregnant (N = 101)	Normotensive pregnant (N = 96)	P
Allele			0.107
I	71 (35.1)	53 (27.6)	
D	131 (64.9)	139 (72.4)	
Genotype			0.244
II	19 (18.8)	10 (10.4)	
ID	33 (32.7)	33 (34.4)	
DD	49 (48.5)	53 (55.2)	
I Carrier			0.347
II + ID	52 (51.5)	43 (44.8)	
DD	49 (48.5)	53 (55.2)	
D Carrier			0.096
II	19 (18.8)	10 (10.4)	
ID + DD	82 (81.2)	86 (89.6)	
ESR1/rs2234693 polymorphism			
	PE pregnant (N = 107)	Normotensive pregnant (N = 102)	P
Allele			0.408
T	102 (47.7)	89 (43.6)	
C	112 (52.3)	115 (56.4)	
Genotype			0.705
TT	29 (27.1)	25 (24.5)	
TC	44 (41.1)	39 (38.2)	
CC	34 (31.8)	38 (37.3)	
T Carrier			0.405
TT + TC	73 (68.2)	64 (62.7)	
CC	34 (31.8)	38 (37.3)	
C Carrier			0.669
TT	29 (27.1)	25 (24.5)	
TC + CC	78 (72.9)	77 (75.5)	
ESR1/rs9340799 polymorphism			
	PE pregnant (N = 107)	Normotensive pregnant women (N = 102)	P
Allele			0.191
A	123 (57.5)	130 (63.7)	
G	91 (42.5)	74 (36.3)	
Genotype			0.350
AA	36 (33.6)	40 (39.2)	
AG	51 (47.7)	50 (49.0)	
GG	20 (18.7)	12 (11.8)	
A Carrier			0.165
AA + AG	87 (81.3)	90 (88.2)	
GG	20 (18.7)	12 (11.8)	
G Carrier			0.403
AA	36 (33.6)	40 (39.2)	
AG + GG	71 (66.4)	62 (60.8)	

The values in parentheses correspond to the frequencies.

polymorphisms, but the ins/del *ACE* polymorphism deviated from Hardy-Weinberg equilibrium in this group ($P = 0.078$; $P = 0.0.846$ and $P = 0.004$, respectively).

There was no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for the ins/del *ACE* and *ESR1*/rs9340799 polymorphisms in the normotensive group, but the *ESR1*/rs2234693 polymorphism showed deviation ($P = 0.193$; $P = 0.670$ and $P = 0.027$, respectively).

The results for the insertion/deletion in the *ACE* gene are shown in Table 2. There was no significant difference for the distribution of I/D allele and genotype frequencies between the two groups ($P = 0.107$ and $P = 0.244$, respectively). Considering the carriers models I (II + ID vs. DD) and D (II vs. ID + DD), similarly, no significant difference was detected ($P = 0.347$; $P = 0.096$, respectively) between PE and normotensive group.

The analyses of the *ESR1* polymorphisms (rs2234693 and rs9340799) revealed no significant differences for the distribution of allele, genotype and carriers models frequencies between the groups (Table 2).

In line with the above data, the analyses for all polymorphisms were also performed in PE women stratified into the early and late clinical forms. No significant results were obtained (data not shown).

4. Discussion

Our findings showed no association among polymorphisms in *ACE* and *ESR1* genes and PE in Brazilian pregnant women. To the best of our knowledge, this is the first study that investigated the polymorphisms rs2234693 and rs9340799 in *ESR1* gene in this group from Brazil.

The three polymorphisms were under Hardy-Weinberg equilibrium in PE and normotensive pregnant groups, except the PE group for *ACE* polymorphism and the normotensive group for *ESR1*/rs2234693 polymorphism. It suggests that there is not a random distribution of these alleles in the studied population. The expected frequencies of DD homozygotes in the *ACE* polymorphism, and CC homozygotes in the *ESR1*/rs2234693 polymorphism were higher than the observed frequencies. Some factors may justify this finding, as the selection and the inbreeding. Since the consanguinity factor among parents of the women enrolled in this study has not been investigated, it cannot be ruled out.

It is known that *ACE* catalyzes the conversion of Ang1 to Ang2, which has a potent vasoconstrictor effect and inactivates the vasodilator bradykinin [9]. It has been demonstrated that *ACE* mRNA expression and activity are altered when there is an insertion (I) or a deletion (D) of a 287-bp fragment in intron 16 of the *ACE* gene. In this sense, three genotypes have been described: II, ID and DD, where the D/D or I/I genotypes are associated with high and low *ACE* activity, respectively, whereas the ID genotype shows an intermediate activity [11,12]. The enhanced activity of *ACE* and binding of Ang2 to angiotensin II type 1 receptor (AT1R) have been associated with diseases in which endothelial damage play an important role [22]. In fact, DD subjects have an increased risk of left ventricular hypertrophy, myocardial infarction and nephropathy [11,23]. Interestingly, the isoform 2 of *ACE* (*ACE2*) produces the vasoprotective Ang-(1–7) peptide, indicating that the vascular homeostasis depends on the balance between *ACE*/Ang2 and *ACE2*/Ang-(1–7) levels [24].

In addition, it is known that the RAAS is regulated during normal pregnancy to control the maternal blood pressure and electrolyte balance. In early gestation, estrogen induces Ang2 production via Agt up-regulation and both Agt and Ang2 levels increase throughout pregnancy. Renin remains similar to the non-pregnant levels until the 20th week of gestation, and then it rises until birth. On the other hand, *ACE* activity remains unchanged during normal pregnancy course [10]. Based on these data, some studies evaluated whether I/D polymorphism in the *ACE* gene could be involved in the PE occurrence. However, the findings are conflicting. In accordance with our findings, two other studies involving Brazilian population found no significant association between the I/D polymorphism and the PE occurrence [25,26]. Similarly, studies performed in other ethnical groups, such as South African, Caucasian and Chinese, reported no association [27–29]. By contrast, studies involving Mexican, South East Iranian, Egyptian and Turkish women pointed to a relationship between the presence of D allele and an increased risk to PE development [30–33]. Kamha et al. reported that the DD genotype was significantly associated with the early-onset PE occurrence in Egyptian women [32]. Of note, severe proteinuria and renal dysfunction were more common in Chinese PE women carrying the D allele [29]. In addition, Mello et al. showed that Italian women with the DD genotype who developed PE had higher umbilical artery pulsatility index values at the 16th, 20th and 24th weeks than those with ID and II genotypes [34].

It is well established that estrogen exerts part of its effects through binding to the nuclear receptor *ESR1*, which is expressed mostly in

human reproductive tissues and also in other tissues, including the smooth muscle and the vascular endothelium [13]. Besides being activated by estrogen, this receptor can be activated by growth factors in the absence of estrogen [35]. Since *ESR1* is widely expressed and can interact with different ligands, its activation is associated with several physiological processes, as well as female reproduction, cardiovascular function and blood coagulation/fibrinolysis [14,36]. During gestation, estrogen binds to its nuclear receptors to control the vascular tone, promote the angiogenesis and uterine blood vessel remodeling [37].

In this context, polymorphisms in the *ESR1* gene (SNPs and tandem repeats) have been associated with cardiovascular disorders, such as hypertension, coronary artery disease and myocardial infarction [38–40]. As PE is a hypertensive disease of the pregnancy and, considering the role of estrogen and *ESR1* in the cardiovascular adaptations during the pregnancy, polymorphisms in the *ESR1* gene have suited as a potential target involved in the PE occurrence. The relationship between the polymorphisms rs2234693/rs9340799 and the risk of PE has been investigated in several populations other than the Brazilian, but the findings are also controversial. In agreement with our results, four studies with different populations (Saudi, Hungarian, Chinese and Austrian) found no significant association between PE risk and the presence of rs2234693 or rs9340799 *ESR1* polymorphisms [16–18,41]. In El-Beshbishy study, the TT/AA and TT/AG combined genotypes were significantly associated with PE occurrence, while patients bearing the CG genotype of the rs9340799 polymorphism had a low risk of PE [16]. However, our data showed no association regarding these combined genotypes and the PE occurrence in Brazilian pregnant women (data not shown). The TT/AA genotype was also associated with an increased risk of PE in Hungary, but the TT/AG genotype was less frequent in preeclamptic than in normotensive pregnant. In addition, PE women carrying the GG genotype of rs9340799 polymorphism had a lower risk of fetal growth restriction [17]. On the other hand, neither combination of genotypes of rs2234693 and rs9340799 *ESR1* polymorphisms were significantly associated with PE risk in Chinese women. However, the normotensive pregnant women who carried CC and CT genotypes had higher systolic blood pressure than TT homozygotes for the rs2234693 polymorphism [18].

The discrepancy among these studies may be partly due to ethnicity. For the Brazilian population, it is particularly important, since Brazilian people results from the miscegenation of Europeans, Africans, and Native Americans for the last five centuries [42]. Additionally, some of the subjects' characteristics may also diverge among the studies, such as the severity and onset of PE, and the gestational age. Moreover, as PE is a multifactorial disease, environmental factors and polymorphisms in genes other than *ACE* and *ESR1* might play an important role in women's susceptibility for its occurrence [18]. Moreover, epigenetic modifications (DNA methylation, histone modification and microRNA regulation) may also contribute to PE pathogenesis [43]. Therefore, more studies are necessary to evaluate the influence of multiple genetic and epigenetic modifications in PE.

As limitations of this study, the relationship between *ACE* and *ESR1* genes' polymorphisms and the activity/expression of the proteins encoded was not evaluated. Although we have excluded some confounding factors in both groups of pregnant women, as co-morbidities, other not controlled factors may have biased the results, such as including only PE women with the severe clinical form and not excluding the women with a familial history of PE. Future studies should carefully examine the influence of these confounding factors and the genotypes or related phenotypes, in order to better understand the genetics of PE.

5. Conclusion

In conclusion, despite the presumed significance of the ins/del *ACE* and rs2234693 and rs9340799 *ESR1* polymorphisms on mechanisms inherent to hypertension and vascular diseases and their previously reported association with PE in studies conducted on different ethnic

groups, our pioneer study did not show an association between these polymorphisms and PE occurrence. Our finding shows that these polymorphisms do not contribute significantly to the development of PE in Brazilian women.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the hospitals and the women who participated in this study. KBG, AT and LMSD are grateful for CNPq fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.04.004>.

Funding

This work was supported by FAPEMIG (00764-16) and CNPq/Brazil under (404353/2016-9).

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

Ethics approvals were obtained from Federal University of Minas Gerais (0530.0.203.000–09) and the public health institutions involved.

Informed consent

All women provided an informed written consent. The participants were also informed that their personal data will be confidential. The protocols of this study did not interfere with any recommendations and prescriptions of the participants.

References

- [1] American College of Obstetricians and Gynecologists, Hypertension in pregnancy. Report of the American college of obstetricians and gynecologists' task force on hypertension in pregnancy, *Obstet. Gynecol.* 122 (5) (2013) 1122–1231 <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88>.
- [2] K.S. Khan, D. Wojdyla, L. Say, et al., WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review, *Lancet* 1 367 (9516) (2006) 1066–1074 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68397-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68397-9).
- [3] L. Duley, The global impact of pre-eclampsia and eclampsia, *Semin. Perinatol.* 33 (3) (2009) 130–137 <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2009.02.010>.
- [4] American College of Obstetricians and Gynecologists, Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183 (1) (2000) S1–S22 <https://doi.org/10.1067/mob.2000.107928>.
- [5] P. von Dadelszen, L.A. Magee, J.M. Roberts, Subclassification of preeclampsia, *Hypertens. Pregnancy* 22 (2) (2003) 143–148 <https://doi.org/10.1081/PRG-120021060>.
- [6] G.A. Dekker, J.I. de Vries, P.M. Doelitzsch, et al., Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173 (4) (1995) 1042–1048 [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(95\)91324-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(95)91324-6).
- [7] T. Chaiworapongsa, P. Chaemsathong, L. Yeo, et al., Pre-eclampsia part I: current understanding of its pathophysiology, *Nat. Rev. Nephrol.* 10 (8) (2014) 466–480 <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.102>.
- [8] F.J. Valenzuela, A. Perez-Sepulveda, M.J. Torres, et al., Pathogenesis of pre-eclampsia: the genetic component, *J. Pregnancy* 2012 (2012) 632732 <https://doi.org/10.1155/2012/632732>.
- [9] J.E. Hall, Control of blood pressure by the renin-angiotensin-aldosterone system, *Clin. Cardiol.* 14 (8 Suppl 4) (1991) IV6–21; <https://doi.org/10.1002/clc.4960141802.IV51-55>.
- [10] E.R. Lumbers, K.G. Pringle, Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 15 (2) (2014) R91–R101 306 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00034.2013>.
- [11] B. Rigat, C. Hubert, F. Alhenc-Gelas, et al., An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels, *J. Clin. Investig.* 86 (4) (1990) 1343–1346 <https://doi.org/10.1172/JCI114844>.

- [12] T. Suehiro, T. Morita, M. Inoue, et al., Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA originating from the ACE allele with deletion, *Hum. Genet.* 115 (2) (2004) 91–96 <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1136-4>.
- [13] I. Paterni, S. Bertini, C. Granchi, et al., Estrogen receptor ligands: a patent review update, *Expert Opin. Ther. Pat.* 23 (10) (2013) 1247–1271 <https://doi.org/10.1517/13543776.2013.805206>.
- [14] M. Jia, K. Dahlman-Wright, J.A. Gustafsson, Estrogen receptor alpha and beta in health and disease, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metabol.* 29 (4) (2015) 557–568 <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>.
- [15] I. Peter, A.M. Shearman, D.R. Zucker, et al., Variation in estrogen-related genes and cross-sectional and longitudinal blood pressure in the Framingham Heart Study, *J. Hypertens.* 23 (12) (2005) 2193–2200 <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000188728.66183.92>.
- [16] H.A. El-Beshbishy, M.A. Tawfeek, N.M. Al-Azhary, et al., Estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms in pre-eclamptic Saudi patients, *Pak J Med Sci* 31 (4) (2015) 880–885 <https://doi.org/10.12669/pjms.314.7541>.
- [17] A. Molvarec, A. Ver, A. Fekete, et al., Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia, *Hypertens. Res.* 30 (3) (2007) 205–211 <https://doi.org/10.1291/hyres.30.205>.
- [18] J. Zhang, H. Bai, X. Liu, et al., Genotype distribution of estrogen receptor alpha polymorphisms in pregnant women from healthy and preeclampsia populations and its relation to blood pressure levels, *Clin. Chem. Lab. Med.* 47 (4) (2009) 391–397 <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.096>.
- [19] W.G. Zhong, Y. Wang, H. Zhu, et al., Meta analysis of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism as a risk factor for preeclampsia in Chinese women, *Genet. Mol. Res.* 13 (3) (2012) 2268–2276 <https://doi.org/10.4238/2012.May.21.1>.
- [20] I. Medica, A. Kastrin, B. Peterlin, Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: a meta-analysis, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 131 (2) (2007) 115–126 <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.10.005>.
- [21] A.P. Shaik, A. Sultana, V.K. Bammidi, et al., A meta-analysis of eNOS and ACE gene polymorphisms and risk of pre-eclampsia in women, *J. Obstet. Gynaecol.* 31 (7) (2011) 603–607 <https://doi.org/10.3109/01443615.2011.598971>.
- [22] J.V. Mombouli, ACE inhibition, endothelial function and coronary artery lesions. Role of kinins and nitric oxide, *Drugs* 54 (Suppl 5) (1997) 12–22 <https://doi.org/10.2165/00003495-199700545-00004>.
- [23] J.E. Jalil, C. Palomera, M.P. Ocaranza, et al., Levels of plasma angiotensin-(1-7) in patients with hypertension who have the angiotensin-I-converting enzyme deletion/deletion genotype, *Am. J. Cardiol.* 15 (6) (2003) 749–751 [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(03\)00847-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(03)00847-6).
- [24] M. Olkowitz, S. Chlopicki, R.T. Smolenski, Perspectives for angiotensin profiling with liquid chromatography/mass spectrometry to evaluate ACE/ACE2 balance in endothelial dysfunction and vascular pathologies, *Pharmacol. Rep.* 67 (4) (2015) 778–785 <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.017>.
- [25] A.O. Galao, L.H. de Souza, B.E. da Costa, et al., Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in preeclampsia and normal pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191 (3) (2004) 821–824 <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.01.047>.
- [26] E.P. Velloso, R. Vieira, A.C. Cabral, et al., Reduced plasma levels of angiotensin-(1-7) and renin activity in preeclamptic patients are associated with the angiotensin I-converting enzyme deletion/deletion genotype, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40 (4) (2007) 583–590 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2007000400018>.
- [27] L. Morgan, F. Foster, R. Hayman, et al., Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and pre-eclamptic pregnancies, *J. Hypertens.* 17 (6) (1999) 765–768 <https://doi.org/10.1097/00004872-199917060-00007>.
- [28] C.B. Roberts, L. Rom, J. Moodley, et al., Hypertension-related gene polymorphisms in pre-eclampsia, eclampsia and gestational hypertension in Black South African women, *J. Hypertens.* 22 (5) (2004) 945–948 <https://doi.org/10.1097/00004872-200405000-00016>.
- [29] H. Li, Y. Ma, Q. Fu, et al., Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (ACE I/D) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) gene polymorphism and its association with preeclampsia in Chinese women, *Hypertens. Pregnancy* 26 (3) (2007) 293–301 <https://doi.org/10.1080/10641950701413676>.
- [30] J.A. Gonzalez-Garrido, J.R. Garcia-Sanchez, J.M. Tovar-Rodriguez, et al., Preeclampsia is associated with ACE I/D polymorphism, obesity and oxidative damage in Mexican women, *Pregnancy Hypertens* 10 (2017) 22–27 <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2017.04.001>.
- [31] S. Salimi, M. Mokhtari, M. Yaghmaei, et al., Association of angiotensin-converting enzyme intron 16 insertion/deletion and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms with preeclampsia in South East of Iran, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 941515 <https://doi.org/10.1155/2011/941515>.
- [32] E.S. Kamha, D.A. Abdelmonsif, T.M.H. Abdeldaim, Angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) polymorphisms in Egyptian pre-eclamptic patients, *Clin. Med. Diagn.* 3 (5) (2013) 123–128 <https://doi.org/10.5923/j.cmd.20130305.06>.
- [33] M.A. Atalay, K. Ozerkan, M. Karkucak, et al., Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme and glutathione s-transferase genes in Turkish population and risk for preeclampsia, *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 39 (4) (2012) 466–469.
- [34] G. Mello, E. Parretti, F. Gensini, et al., Maternal-fetal flow, negative events, and preeclampsia: role of ACE I/D polymorphism, *Hypertension* 41 (4) (2003) 932–937 <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000063146.40351.AD>.
- [35] M.E. Mendelsohn, Protective effects of estrogen on the cardiovascular system, *Am. J. Cardiol.* 20 (12A) (2002) 89 12E-17E; discussion 17E-18E [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02405-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02405-0).
- [36] F.R. Rosendaal, Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005 (2005) 1–12 <https://doi.org/10.1182/asheducation-2005.1.1>.
- [37] M.B. Pastore, S.O. Jobe, J. Ramadoss, et al., Estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta in the uterine vascular endothelium during pregnancy: functional implications for regulating uterine blood flow, *Semin. Reprod. Med.* 30 (1) (2012) 46–61 <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299597>.
- [38] S. Lehrer, J. Rabin, T. Kalir, et al., Estrogen receptor variant and hypertension in women, *Hypertension* 21 (4) (1993) 439–441 <https://doi.org/10.1161/01.hyp.21.4.439>.
- [39] A.M. Shearman, L.A. Cupples, S. Demissie, et al., Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease, *JAMA* 5 290 (17) (2003) 2263–2270 <https://doi.org/10.1001/jama.290.17.2263>.
- [40] S.C. Schuit, H.H. Oei, J.C. Witteman, et al., Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction, *J. Am. Med. Assoc.* 23 (24) (2004) 2969–2977 <https://doi.org/10.1001/jama.291.24.2969>.
- [41] C.B. Tempfer, S. Jirecek, E.K. Riener, et al., Polymorphisms of thrombophilic and vasoactive genes and severe preeclampsia: a pilot study, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 11 (4) (2004) 227–231 <https://doi.org/10.1016/j.jsigi.2003.12.002>.
- [42] S.D. Pena, L. Bastos-Rodrigues, J.R. Pimenta, et al., DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42 (10) (2009) 870–876 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009050000026>.
- [43] V. Januar, G. Desoye, B. Novakovic, et al., Epigenetic regulation of human placental function and pregnancy outcome: considerations for causal inference, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 213 (4 Suppl) (2015) S182–S196 <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.011>.
- [44] Castellano, et al., Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population. The Vobarno Study, *Circulation* 91 (11) (1995 Jun 1) 2721–2724.

ARTIGO 4 - Are endocan plasma levels altered in preeclampsia?

LOPES, Ana Cristina dos Santos; MARTINS, Suellen Rodrigues; DUSSE, Luci Maria Santanna; PINHEIRO, Melina de Barros; ALPOIM, Patrícia Nessralla. Are endocan plasma levels altered in preeclampsia?. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 43, p. 232-234, 2021. DOI: 10.1055/s-0041-1728661

Carta ao editor publicada na Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Qualis B1) em 2021.



Are Endocan Plasma Levels Altered in Preeclampsia?

Ana Cristina dos Santos Lopes¹ Suellen Rodrigues Martins¹ Luci Maria SantAna Dusse¹
Melina de Barros Pinheiro² Patrícia Nessler Alpoim¹

¹ Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

² Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis, MG, Brazil

Address for correspondence: Patrícia Nessler Alpoim, Room 4104-B3, 6627, Antônio Carlos Ave, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil (e-mail: patnessralla@yahoo.com.br).

Rev Bras Ginecol Obstet 2021;43(3):232–234.

Dear Editor,

Our research group has been studying preeclampsia (PE) for over a decade aiming to detect possible blood biomarkers of hemostasis,^{1–5} inflammation,^{6,7} and endothelial dysfunction^{8–10} that could be useful for the diagnosis of PE. Until today, only the onset of hypertension (≥ 140 mmHg systolic or ≥ 90 mmHg diastolic) on or after 20 weeks of gestation in association or not with proteinuria and/or evidences of multisystem impairment (such as renal, liver and neurological dysfunctions) is an acceptable criterion to establish the diagnosis of this gestational disease.¹¹ It is important to emphasize that PE affects between 2 and 8% of all pregnancies worldwide, an early diagnosis of the disease, before the occurrence of systematic impairment, is still not available, which motivates our arduous search for laboratory markers of PE.^{12,13}

Endocan is a biochemical marker of endothelial dysfunction that is potentially associated with immunoinflammatory response.^{14,15} Previous data of our group showed that endothelial dysfunction and inflammation are important features in PE.^{6,8,9} Aiming to determine if endocan plasma levels could be useful for determining PE predisposition and/or development, we investigate its levels in preeclamptic and normotensive pregnant women from the southeastern state of Minas Gerais, Brazil.

Our case-control study included 80 Brazilian pregnant women, 40 with severe PE (≥ 160 mmHg systolic or > 110 mmHg diastolic pressure) and 40 normotensive pregnant women (controls). Endocan levels were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics for Windows, version 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Data

normality was tested by the Shapiro-Wilk test. The differences in endocan levels between the PE and normotensive groups were assessed by the Mann-Whitney test. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

Surprisingly, no significant difference was observed comparing endocan plasma levels between PE (0.388 ng/mL [0.346–0.516]) and normotensive pregnant women (0.393 ng/mL [0.321–0.623]) ($p = 0.870$). We classified PE by the onset time of clinical symptoms, such as early (< 34 weeks) or late PE (≥ 34 weeks),³ and compared endocan levels in these groups. Again, no significant difference was observed for early (0.385 ng/mL [0.311–0.459]) and late PE (0.407 ng/mL [0.313–0.500]) and normotensive pregnant women (0.393 ng/mL [0.244–0.542]) ($p = 0.851$).

A review of the literature showed eight studies that investigated endocan in women with PE.^{16–23} According to our data, two studies showed no significant difference between endocan levels in preeclamptic versus normotensive pregnancy.^{16,18} However, five studies revealed increased levels in women with PE versus normotensive pregnancy^{17,19,21–23} and two studies showed that endocan protein in the placenta tissue is upregulated in PE^{18,20} suggesting its involvement in the pathogenesis of PE. Of note, among the studies that found a positive association between endocan levels and PE development, one was also conducted in Brazil.²² It is well-established that high levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are able to stimulate the expression of endocan.^{24,25} It should be highlighted that the women with PE of the present study showed no previous increase of TNF- α plasma levels³ and lower VEGF levels²⁶ comparing with normotensive pregnant. These data could justify why

received
August 21, 2020
accepted
February 4, 2021

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0041-1728661>.
ISSN 0100-7203.

© 2021, Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. All rights reserved.

This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution License, permitting unrestricted use, distribution, and reproduction so long as the original work is properly cited. (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
Thieme Revinter Publicações Ltda., Rua do Matoso 170, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20270-135, Brazil

endocan levels were not elevated in the women with PE studied.

Interestingly, Chang et al.¹⁸ related that, although plasma levels of endocan do not correlate with the occurrence of PE, an increased expression of mRNA and endocan were found in the placenta of women with PE, it could suggest that endocan is related to PE pathophysiology, but only in the microenvironment of the placenta, not reflecting the placental changes in plasma. Therefore, our research group aims to evaluate the expression of endocan in the placenta, in addition to repeating the plasma analyzes in a larger sample, to confirm that the results are in fact not significant in the population studied.

In conclusion, our findings showed no association between endocan levels and PE occurrence in Brazilian pregnant women. The role of endocan as endothelial function biomarker is unquestionable. Since endothelial dysfunction and systematic inflammatory response are among the key pathophysiological mechanisms for PE, future studies are required to investigate how endocan is involved in the occurrence of PE.

Funding

The authors thank the staff of the hospitals and the women who participated in the present study. Dusse L. M. S. is grateful for the CNPq fellowship. The present study was supported by FAPEMIG under grant number 00764-16; and CNPq/Brazil under grant number 404353/2016-9.

Conflict to Interests

The authors have no conflict of interests to declare.

References

- Dusse L, Godoi L, Kazmi RS, Alpoim P, Petterson J, Lwaleed BA, et al. Sources of thrombomodulin in pre-eclampsia: renal dysfunction or endothelial damage? *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(02):153–157. Doi: 10.1055/s-0030-1270343
- Dusse LM, Alpoim PN, Lwaleed BA, de Sousa LP, Carvalho Md, Gomes KB. Is there a link between endothelial dysfunction, coagulation activation and nitric oxide synthesis in preeclampsia? *Clin Chim Acta*. 2013;415:226–229. Doi: 10.1016/j.cca.2012.10.006
- Pinheiro MB, Carvalho MG, Martins-Filho OA, Freitas LG, Godoi LC, Alpoim PN, et al. Severe preeclampsia: are hemostatic and inflammatory parameters associated? *Clin Chim Acta*. 2014;427:65–70. Doi: 10.1016/j.cca.2013.09.050
- Alpoim PN, Godoi LC, Freitas LG, Pinheiro MdeB, Gomes KB, Dusse LM. Is intraplatelet cGMP jeopardized to inhibit platelet activation in severe preeclampsia? *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26(06):711–713. Doi: 10.1097/MBC.0000000000000226
- Lucena FC, Lage EM, Teixeira PG, Barbosa AS, Diniz R, Lwaleed B, et al. Longitudinal assessment of D-dimer and plasminogen activator inhibitor type-1 plasma levels in pregnant women with risk factors for preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2019;38(01):58–63. Doi: 10.1080/10641955.2019.1577435
- Pinheiro MB, Martins-Filho OA, Mota AP, Alpoim PN, Godoi LC, Silveira ACO, et al. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine*. 2013;62(01):165–173. Doi: 10.1016/j.cyto.2013.02.027
- Perucci LO, Gomes KB, Freitas LG, Godoi LC, Alpoim PN, Pinheiro MB, et al. Soluble endoglin, transforming growth factor-Beta 1 and soluble tumor necrosis factor alpha receptors in different clinical manifestations of preeclampsia. *PLoS One*. 2014;9(05):e97632. Doi: 10.1371/journal.pone.0097632
- Alpoim PN, Godoi LC, Freitas LG, Gomes KB, Dusse LM. Assessment of L-arginine asymmetric 1 dimethyl (ADMA) in early-onset and late-onset (severe) preeclampsia. *Nitric Oxide*. 2013;33:81–82. Doi: 10.1016/j.niox.2013.07.006
- Alpoim PN, Gomes KB, Pinheiro MdeB, Godoi LC, Jardim LL, Muniz LG, et al. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. *Nitric Oxide*. 2014;42:19–23. Doi: 10.1016/j.niox.2014.07.006
- Alpoim PN, Perucci LO, Godoi LC, Goulart COL, Dusse LMS. Oxidative stress markers and thrombomodulin plasma levels in women with early and late severe preeclampsia. *Clin Chim Acta*. 2018;483:234–238. Doi: 10.1016/j.cca.2018.04.039
- American College of Obstetricians and Gynecologists Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2013;122(05):1122–1131. Doi: 10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88
- Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*. 2006;367(9516):1066–1074. Doi: 10.1016/S0140-6736(06)68397-9
- Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009;33(03):130–137. Doi: 10.1053/j.semperi.2009.02.010
- Kali A, Shetty KS. Endocan: a novel circulating proteoglycan. *Indian J Pharmacol*. 2014;46(06):579–583. Doi: 10.4103/0253-7613.144891
- Balta S, Mikhailidis DP, Demirkol S, Ozturk C, Celik T, Iyisoy A. Endocan: A novel inflammatory indicator in cardiovascular disease? *Atherosclerosis*. 2015;243(01):339–343. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.030
- Yuksel MA, Tuten A, Oncul M, Acikgoz AS, Yuksel IT, Toprak MS, et al. Serum endocan concentration in women with pre-eclampsia. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;292(01):69–73. Doi: 10.1007/s00404-014-3605-x
- Cakmak M, Yilmaz H, Bağlar E, Darcin T, Inan O, Aktas A, et al. Serum levels of endocan correlate with the presence and severity of pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens*. 2016;38(02):137–142. Doi: 10.3109/10641963.2015.1060993
- Chang X, Bian Y, Wu Y, Huang Y, Wang K, Duan T. Endocan of the maternal placenta tissue is increased in pre-eclampsia. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):14733–14740
- Hentschke MR, Lucas LS, Mistry HD, Pinheiro da Costa BE, Poli-de-Figueiredo CE. Endocan-1 concentrations in maternal and fetal plasma and placenta in pre-eclampsia in the third trimester of pregnancy. *Cytokine*. 2015;74(01):152–156. Doi: 10.1016/j.cyto.2015.04.013
- Chew BS, Ghazali R, Othman H, Ismail NAM, Othman AS, Laim NMST, et al. Endocan expression in placenta of women with hypertension. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;45(02):345–351. Doi: 10.1111/jjog.13836
- Adekola H, Romero R, Chaemsaihong P, Korzeniowski SJ, Dong Z, Yeo L, et al. Endocan, a putative endothelial cell marker, is elevated in preeclampsia, decreased in acute pyelonephritis, and unchanged in other obstetrical syndromes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015;28(14):1621–1632. Doi: 10.3109/14767058.2014.964676
- Hentschke MR, da Cunha Filho EV, Vieira MC, Paula LG, Mistry HD, Costa BEP, et al. Negative correlation between placental growth factor and endocan-1 in women with preeclampsia. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2018;40(10):593–598. Doi: 10.1055/s-0038-1670713
- Schuitmaker JHN, Cremers TIFH, Van Pampus MG, Scherjon SA, Faas MM. Changes in endothelial cell specific molecule 1 plasma levels during preeclamptic pregnancies compared to healthy pregnancies. *Pregnancy Hypertens*. 2018;12:58–64. Doi: 10.1016/j.preghy.2018.02.012

234 Letter to the Editor

- 24 Delehedde M, Devenyns L, Maurage CA, Vivès RR. Endocan in cancers: a lesson from a circulating dermatan sulfate proteoglycan. *Int J Cell Biol*. 2013;2013:705027. Doi: 10.1155/2013/705027
- 25 Shin JW, Huggenberger R, Detmar M. Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis. *Blood*. 2008;112(06):2318–2326. Doi: 10.1182/blood-2008-05-156331
- 26 Rios DRA, Alpoim PN, Godoi LC, Perucci LO, Sousa LR, Gomes KB, et al. Increased levels of sENG and sVCAM-1 and decreased levels of VEGF in severe preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2016;29(11):1307–1310. Doi: 10.1093/ajh/hpv170

5 CONCLUSÃO

A conclusão deste estudo sobre a pré-eclâmpsia (PE) destaca a relevância dos microRNAs como potenciais biomarcadores para a predição e classificação dessa condição. Através de uma revisão sistemática, foi possível identificar diferentes perfis de expressão de microRNAs associados à PE, sugerindo que esses pequenos RNAs não codificantes desempenham um papel crucial na patogênese da doença. A identificação de microRNAs diferencialmente expressos oferece novas perspectivas para o desenvolvimento de testes diagnósticos mais precisos e protocolos de monitoramento que possam ser implementados desde as fases iniciais da gestação.

Além dos microRNAs, o estudo também avaliou a influência de outros marcadores genéticos e bioquímicos, como os polimorfismos nos genes DDAH2, ECA e ESR1, além dos níveis plasmáticos de endocan. Esses achados contribuem para um entendimento mais abrangente dos mecanismos moleculares envolvidos na PE, fornecendo subsídios importantes para a personalização do acompanhamento clínico de gestantes em risco. A impossibilidade de realizar coleta de amostras biológicas devido à pandemia de COVID-19 foi contornada com a revisão sistemática, que ainda assim permitiu a redação de artigos significativos na área.

Por fim, este trabalho abre caminhos para futuras pesquisas experimentais que poderão validar e expandir os conhecimentos adquiridos. O mapeamento dos perfis de expressão de microRNAs e a análise de outros marcadores genéticos podem, em longo prazo, transformar a abordagem clínica da pré-eclâmpsia, permitindo intervenções mais eficazes e oportunas, com o potencial de melhorar significativamente os desfechos maternos e fetais. Assim, este estudo não apenas contribui para o corpo de conhecimento existente, mas também se posiciona como uma referência fundamental para futuros avanços no campo da medicina materno-fetal.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Ahmed M. *et al.* 418 Role of miRNA-452 expression in the pathogenesis of early onset preeclampsia: a case-control study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 224, n. 2, p. S268–S269, fev. 2021.

ACOG. Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*, v. 135, n. 6, p. e237–e260, jun. 2020.

ADEKOLA, Henry *et al.* Endocan, a putative endothelial cell marker, is elevated in preeclampsia, decreased in acute pyelonephritis, and unchanged in other obstetrical syndromes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 28, n. 14, p. 1621–1632, 22 set. 2015.

AJITH, ANUSHKA. *The role of peripheral natural killer cells in immunocompromised pre-eclamptic and normotensive pregnant black South Africans*. 2016. 1–185 f. Tese de doutorado – University of KwaZulu-Natal, Durban, 2016.

AKEHURST, Christine *et al.* Differential expression of microRNA-206 and its target genes in preeclampsia. *Journal of Hypertension*, v. 33, n. 10, p. 2068–2074, out. 2015.

ALPOIM, Patrícia Nessleralla; GODOI, Lara Carvalho; *et al.* Assessment of l-arginine asymmetric 1 dimethyl (ADMA) in early-onset and late-onset (severe) preeclampsia. *Nitric Oxide*, v. 33, p. 81–82, set. 2013.

ALPOIM, Patrícia Nessleralla *et al.* Is intraplatelet cGMP jeopardized to inhibit platelet activation in severe preeclampsia? *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v. 26, n. 6, p. 711–713, set. 2015.

ALPOIM, Patrícia Nessralla *et al.* Oxidative stress markers and thrombomodulin plasma levels in women with early and late severe preeclampsia. *Clinica Chimica Acta*, v. 483, p. 234–238, ago. 2018.

ALPOIM, Patrícia Nessralla *et al.* Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. *Nitric Oxide*, v. 42, p. 19–23, nov. 2014.

ALPOIM, Patrícia Nessralla; PINHEIRO, Melina de Barros; *et al.* Pré-eclâmpsia: o que há de anômalo na placentação? *Femina*, v. 41, n. 2, 2013.

AMARAL, Lorena M. *et al.* Pathophysiology and Current Clinical Management of Preeclampsia. *Current Hypertension Reports*, v. 19, n. 8, p. 61, 8 ago. 2017.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Hypertension in Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, v. 122, n. 5, p. 1122–1131, nov. 2013.

ANTONIOU, Stavros A.; ANTONIOU, George A. The GRADE approach to appraising the evidence or how to increase the credibility of your research. *The American Journal of Surgery*, v. 220, n. 2, p. 290–293, ago. 2020.

AOKI, Youichi *et al.* Effect on the Production of Soluble Endoglin from Human Choriocarcinoma Cells by Preeclampsia Sera. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 67, n. 5, p. 413–420, maio 2012.

AROMATARIS, Edoardo; PEARSON, Alan. The Systematic Review. *AJN, American Journal of Nursing*, v. 114, n. 3, p. 53–58, mar. 2014.

ARTEMIEVA, K. A. *et al.* Regulation of the Placental Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, v. 507, n. 1, p. 256–263, 29 dez. 2022.

ATALAY, M A *et al.* Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme and glutathione s-transferase genes in Turkish population and risk for preeclampsia. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, v. 39, n. 4, p. 466–9, 2012.

AWAMLEH, Zain; GLOOR, Gregory B.; HAN, Victor K. M. Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: potential impact on gene expression and pathophysiology. *BMC Medical Genomics*, v. 12, n. 1, p. 91, 27 dez. 2019.

AYE, Irving L.M.H. *et al.* Increasing Maternal Body Mass Index Is Associated with Systemic Inflammation in the Mother and the Activation of Distinct Placental Inflammatory Pathways¹. *Biology of Reproduction*, v. 90, n. 6, 1 jun. 2014.

AYLING, L. J. *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) regulates trophoblast invasion and motility through effects on nitric oxide. *Human Reproduction*, v. 21, n. 10, p. 2530–2537, 1 out. 2006.

BALSHEM, Howard *et al.* GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 64, n. 4, p. 401–406, abr. 2011.

BALTA, Sevket *et al.* Endocan: A novel inflammatory indicator in cardiovascular disease? *Atherosclerosis*, v. 243, n. 1, p. 339–343, nov. 2015.

BARTSCH, Emily *et al.* Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *BMJ*, p. i1753, 19 abr. 2016.

BASSO, Olga; CHRISTENSEN, Kaare; OLSEN, Jørn. Higher risk of pre-eclampsia after change of partner. An effect of longer interpregnancy intervals? *Epidemiology*, v. 12, n. 6, p. 624–629, nov. 2001.

BELL, Mandy J.; CONLEY, Yvette P. A Systematic Review of Endoglin Gene Expression in Preeclampsia. *Biological Research For Nursing*, v. 15, n. 2, p. 129–136, 15 abr. 2013.

BHASKARAN, M.; MOHAN, M. MicroRNAs. *Veterinary Pathology*, v. 51, n. 4, p. 759–774, 17 jul. 2014.

BICUDO, Maria Aparecida Viggiani. Meta-análise: seu significado para a pesquisa qualitativa. *Revemat: revista eletrônica de educação matemática*, v. 9, n. 0, p. 7, 29 jul. 2014.

BILANO, Ver Luanni *et al.* Risk Factors of Pre-Eclampsia/Eclampsia and Its Adverse Outcomes in Low- and Middle-Income Countries: A WHO Secondary Analysis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, p. e91198, 21 mar. 2014.

BOBST, S *et al.* Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion. *American Journal of Hypertension*, v. 18, n. 3, p. 330–336, mar. 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. *Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados*. Brasília - DF: Editora do Ministério da Saúde, 2012.

BROSENS, I. A STUDY OF THE SPIRAL ARTERIES OF THE DECIDUA BASALIS IN NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE PREGNANCIES. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, v. 71, n. 2, p. 222–230, 23 abr. 1964.

BROSENS, Ivo *et al.* The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 204, n. 3, p. 193–201, mar. 2011.

BUHIMSCHI, Irina A. *et al.* Protein misfolding, congophilia, oligomerization, and defective amyloid processing in preeclampsia. *Science Translational Medicine*, v. 6, n. 245, 16 jul. 2014.

CAKMAK, Muzaffer *et al.* Serum levels of endocan correlate with the presence and severity of pre-eclampsia. *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 38, n. 2, p. 137–142, 17 fev. 2016.

CANIGGIA, I. *et al.* Oxygen and Placental Development During the First Trimester: Implications for the Pathophysiology of Pre-eclampsia. *Placenta*, v. 21, p. S25–S30, mar. 2000.

CHAIWORAPONGSA, Tinnakorn *et al.* Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 17, n. 1, p. 3–18, 1 jan. 2005.

CHAIWORAPONGSA, Tinnakorn *et al.* Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nature Reviews Nephrology*, v. 10, n. 8, p. 466–480, 8 ago. 2014.

CHANG, Xinwen *et al.* Endocan of the maternal placenta tissue is increased in pre-eclampsia. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 8, n. 11, p. 14733–40, 2015.

CHEN, Yu *et al.* Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 119, n. 3, p. 234–238, dez. 2012.

CHEW, Bee S. *et al.* Endocan expression in placenta of women with hypertension. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, v. 45, n. 2, p. 345–351, 10 fev. 2019.

CIRKOVIC, Andja *et al.* Preeclamptic Women Have Disrupted Placental microRNA Expression at the Time of Preeclampsia Diagnosis: Meta-Analysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, 24 dez. 2021.

CLARK, Andrew G. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genetic Epidemiology*, v. 27, n. 4, p. 321–333, 14 dez. 2004.

CONDE-AGUDELO, A. Maternal morbidity and mortality associated with interpregnancy interval: cross sectional study. *BMJ*, v. 321, n. 7271, p. 1255–1259, 18 nov. 2000.

CORDEIRO, Alexander Magno *et al.* Revisão sistemática: uma revisão narrativa. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 34, n. 6, p. 428–431, dez. 2007.

COSTA, Rafaela A. *et al.* Preeclampsia and superimposed preeclampsia: The same disease? The role of angiogenic biomarkers. *Hypertension in Pregnancy*, v. 35, n. 2, p. 139–149, 2 abr. 2016.

CRAWFORD, Dana C.; NICKERSON, Deborah A. Definition and Clinical Importance of Haplotypes. *Annual Review of Medicine*, v. 56, n. 1, p. 303–320, 1 fev. 2005.

CUDMORE, Melissa *et al.* Negative Regulation of Soluble Flt-1 and Soluble Endoglin Release by Heme Oxygenase-1. *Circulation*, v. 115, n. 13, p. 1789–1797, 3 abr. 2007.

DAGLAR, Korkut *et al.* Placental levels of total oxidative and anti-oxidative status, ADAMTS-12 and decorin in early- and late-onset severe preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 29, n. 24, p. 4059–4064, 16 dez. 2016.

DAI, Bingqin *et al.* The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: A meta-analysis. *Gene*, v. 519, n. 1, p. 187–193, abr. 2013.

DECHEND, Ralf *et al.* AT₁ Receptor Agonistic Antibodies From Preeclamptic Patients Stimulate NADPH Oxidase. *Circulation*, v. 107, n. 12, p. 1632–1639, abr. 2003.

DEEKS, Jonathan J; HIGGINS, Julian PT; ALTMAN, Douglas G. Analysing data and undertaking meta-analyses. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. [S.l.]: Wiley, 2019. p. 241–284.

DEKKER, G.A. *et al.* Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 173, n. 4, p. 1042–1048, out. 1995.

DE-LA-TORRE-UGARTE-GUANILO, Mônica Cecilia; TAKAHASHI, Renata Ferreira; BERTOLOZZI, Maria Rita. Revisão sistemática: noções gerais. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 45, n. 5, p. 1260–1266, out. 2011.

DETTORI, Joseph R.; NORVELL, Daniel C.; CHAPMAN, Jens R. Seeing the Forest by Looking at the Trees: How to Interpret a Meta-Analysis Forest Plot. *Global Spine Journal*, v. 11, n. 4, p. 614–616, 3 maio 2021.

DINESEN, Sofie *et al.* Circulating microRNA as Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus—A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 7, p. 6186, 24 mar. 2023.

DONATO, Helena; DONATO, Mariana. Etapas na Condução de uma Revisão Sistemática. *Acta Médica Portuguesa*, v. 32, n. 3, p. 227–235, 29 mar. 2019.

DUCKITT, Kirsten; HARRINGTON, Deborah. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*, v. 330, n. 7491, p. 565, 12 mar. 2005.

DULEY, Lelia. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Seminars in Perinatology*, v. 33, n. 3, p. 130–137, jun. 2009.

DUSSE, Luci *et al.* Sources of Thrombomodulin in Pre-Eclampsia: Renal Dysfunction or Endothelial Damage? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 37, n. 02, p. 153–157, 2 mar. 2011.

DUSSE, Luci Maria *et al.* Is there a link between endothelial dysfunction, coagulation activation and nitric oxide synthesis in preeclampsia? *Clinica Chimica Acta*, v. 415, p. 226–229, jan. 2013.

EL-BESHBISHY, Hesham Abdelaziz *et al.* Estrogen Receptor Alpha (ESR1) Gene Polymorphisms in Pre-eclamptic Saudi Patients. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, v. 31, n. 4, p. 880–885, 31 dez. 2015.

ELVIK, Rune. Can We Trust the Results of Meta-Analyses? *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board*, v. 1908, n. 1, p. 221–229, 21 jan. 2005.

FEENSTRA, Marjon *et al.* Systemic Oxidative Stress in Severe Early-Onset Fetal Growth Restriction Associates with Concomitant Pre-Eclampsia, Not with Severity of Fetal Growth Restriction. *Antioxidants*, v. 13, n. 1, p. 46, 26 dez. 2023.

FERENHOF, Helio Aisenberg; FERNANDES, Roberto Fabiano. Desmistificando a revisão de literatura como base para redação científica: método SFF. *Revista ACB*, v. 21, n. 3, p. 550–563, 2016.

FIGUEIREDO FILHO, Dalson Britto *et al.* O que é, para que serve e como se faz uma meta-análise? *Teoria & Pesquisa Revista de Ciência Política*, v. 23, n. 2, 2015.

FU, Guodong *et al.* MicroRNA-376c Impairs Transforming Growth Factor- β and Nodal Signaling to Promote Trophoblast Cell Proliferation and Invasion. *Hypertension*, v. 61, n. 4, p. 864–872, abr. 2013.

GAD, MOHAMED Z. *et al.* Association of DDAH2 gene polymorphism with cardiovascular disease in Egyptian patients. *Journal of Genetics*, v. 90, n. 1, p. 161–163, 24 abr. 2011.

GALÃO, Adriani O. *et al.* Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in preeclampsia and normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 191, n. 3, p. 821–824, set. 2004.

GALVÃO, Maria Cristiane Barbosa; RICARTE, Ivan Luiz Marques. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA: CONCEITUAÇÃO, PRODUÇÃO E PUBLICAÇÃO. *Logeion: Filosofia da Informação*, v. 6, n. 1, p. 57–73, 15 set. 2019.

GAO, Lu; JIANG, Feng. MicroRNA (miRNA) Profiling. [S.l: s.n.], 2016. p. 151–161.

GATHIRAM, P; MOODLEY, J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. *Cardiovascular Journal of Africa*, v. 27, n. 2, p. 71–78, 18 maio 2016.

GERMAIN, Sarah J. *et al.* Systemic Inflammatory Priming in Normal Pregnancy and Preeclampsia: The Role of Circulating Syncytiotrophoblast Microparticles. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 9, p. 5949–5956, 1 maio 2007.

GIANNUBILO, Stefano Raffaele *et al.* Circulating miRNAs and Preeclampsia: From Implantation to Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 3, p. 1418, 24 jan. 2024.

GLUHOVSCHI, Cristina *et al.* Pregnancy Associated with Systemic Lupus Erythematosus: Immune Tolerance in Pregnancy and Its Deficiency in Systemic Lupus Erythematosus—An Immunological Dilemma. *Journal of Immunology Research*, v. 2015, p. 1–11, 2015.

GONZÁLEZ-GARRIDO, José A. *et al.* Preeclampsia is associated with ACE I/D polymorphism, obesity and oxidative damage in Mexican women. *Pregnancy Hypertension*, v. 10, p. 22–27, out. 2017.

GOVENDER, Nalini; NAICKER, Thajasvarie; MOODLEY, Jagidesa. Maternal imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors in HIV-infected women with pre-eclampsia : cardiovascular topics. *Cardiovascular Journal Of Africa*, v. 24, n. 5, p. 174–179, 2 ago. 2013.

HABLI, Mounira *et al.* Long-term maternal and subsequent pregnancy outcomes 5 years after hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 201, n. 4, p. 385.e1-385.e5, out. 2009.

HALL, John E. Control of blood pressure by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Clinical Cardiology*, v. 14, n. S4, p. 6–21, 22 ago. 1991.

HANSSON, Stefan R.; NÄSÄNEN, Åsa; ERLANDSSON, Lena. Oxidative stress in preeclampsia and the role of free fetal hemoglobin. *Frontiers in Physiology*, v. 5, 13 jan. 2015.

HENTSCHKE, Marta Ribeiro *et al.* Endocan-1 concentrations in maternal and fetal plasma and placentae in pre-eclampsia in the third trimester of pregnancy. *Cytokine*, v. 74, n. 1, p. 152–156, jul. 2015.

HENTSCHKE, Marta Ribeiro *et al.* Negative Correlation between Placental Growth Factor and Endocan-1 in Women with Preeclampsia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics*, v. 40, n. 10, p. 593–598, 23 out. 2018.

HERSE, Florian *et al.* Prevalence of Agonistic Autoantibodies Against the Angiotensin II Type 1 Receptor and Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1 in a Gestational Age-Matched Case Study. *Hypertension*, v. 53, n. 2, p. 393–398, fev. 2009.

HOLWERDA, Kim M. *et al.* Hydrogen Sulfide Attenuates sFlt1-Induced Hypertension and Renal Damage by Upregulating Vascular Endothelial Growth Factor. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 25, n. 4, p. 717–725, abr. 2014.

HOLWERDA, K.M. *et al.* Hydrogen sulfide producing enzymes in pregnancy and preeclampsia. *Placenta*, v. 33, n. 6, p. 518–521, jun. 2012.

HUNG, Tai-Ho; BURTON, Graham J. Hypoxia and Reoxygenation: a Possible Mechanism for Placental Oxidative Stress in Preeclampsia. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 45, n. 3, p. 189–200, set. 2006.

JAIRAJPURI, Deeba S. *et al.* Circulating microRNA expression as predictor of preeclampsia and its severity. *Gene*, v. 627, p. 543–548, set. 2017.

JALIL, Jorge E. *et al.* Levels of plasma angiotensin-(1-7) in patients with hypertension who have the angiotensin-I-converting enzyme deletion/deletion genotype. *The American Journal of Cardiology*, v. 92, n. 6, p. 749–751, set. 2003.

JANUAR, Vania *et al.* Epigenetic regulation of human placental function and pregnancy outcome: considerations for causal inference. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 213, n. 4, p. S182–S196, out. 2015.

JEBBINK, Jiska *et al.* Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome — A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1822, n. 12, p. 1960–1969, dez. 2012.

JENA, Monalisa *et al.* Pregnancy induced hypertension & pre eclampsia: Pathophysiology & recent management trends: A review. *Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, v. 5, n. 3, p. 326–334, 2016.

JIA, Min; DAHLMAN-WRIGHT, Karin; GUSTAFSSON, Jan-Åke. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 29, n. 4, p. 557–568, ago. 2015.

JIANG, Yan *et al.* microRNA-140-5p from human umbilical cord mesenchymal stem cells–released exosomes suppresses preeclampsia development. *Functional & Integrative Genomics*, v. 22, n. 5, p. 813–824, 28 out. 2022.

JORGE, Ariany Lima *et al.* MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. *Einstein (São Paulo)*, v. 19, 6 jul. 2021.

KALI, Arunava; SHETTY, K.S.Rathan. Endocan: A novel circulating proteoglycan. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 46, n. 6, p. 579, 2014.

KAMHA, Eman S.; ABDELMONSIF, Doaa A.; ABDELDAIM, Tamer MH. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) polymorphisms in Egyptian preeclamptic patients. *Clinical Medicine and Diagnostics*, v. 3, n. 5, p. 123–128, 2013.

KARUMANCHI, S. Ananth; STILLMAN, Isaac E.; LINDHEIMER, Marshall D. Angiogenesis and Preeclampsia. *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*. [S.l.]: Elsevier, 2009. p. 87–103.

KENNY, Louise C. *et al.* Early Pregnancy Prediction of Preeclampsia in Nulliparous Women, Combining Clinical Risk and Biomarkers. *Hypertension*, v. 64, n. 3, p. 644–652, set. 2014.

KHAN, Khalid S *et al.* WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *The Lancet*, v. 367, n. 9516, p. 1066–1074, abr. 2006.

KHODZHAEVA, Zulfiya S. *et al.* Clinical and pathogenetic features of early- and late-onset pre-eclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 29, n. 18, p. 2980–2986, 16 set. 2016.

KNIGHT, Kristin M. *et al.* Perinatal outcomes in type 2 diabetic patients compared with non-diabetic patients matched by body mass index. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 25, n. 6, p. 611–615, 5 jun. 2012.

KOCH, Pia F. *et al.* miRNA as potential biomarkers after liver transplantation: A systematic review. *Transplantation Reviews*, v. 38, n. 2, p. 100831, abr. 2024.

KULANDAVELU, Shathiyah *et al.* Endothelial Nitric Oxide Synthase Deficiency Reduces Uterine Blood Flow, Spiral Artery Elongation, and Placental Oxygenation in Pregnant Mice. *Hypertension*, v. 60, n. 1, p. 231–238, jul. 2012.

KUMAR, Ashok *et al.* IL-10, TNF- α & IFN- γ : Potential early biomarkers for preeclampsia. *Cellular Immunology*, v. 283, n. 1–2, p. 70–74, maio 2013.

LAMARCA, Babbette; CORNELIUS, Denise; WALLACE, Kedra. Elucidating Immune Mechanisms Causing Hypertension During Pregnancy. *Physiology*, v. 28, n. 4, p. 225–233, jul. 2013.

LAMBDEN, Simon *et al.* Evidence for a protective role for the rs805305 single nucleotide polymorphism of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2) in septic shock through the regulation of DDAH activity. *Critical Care*, v. 22, n. 1, p. 336, 11 dez. 2018.

LARESGOITI-SERVITJE, Estibalitz. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 94, n. 2, p. 247–257, 30 abr. 2013.

LAU, Sien Yee *et al.* Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-6, and Interleukin-10 Levels are Altered in Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Reproductive Immunology*, p. n/a-n/a, jun. 2013.

LEHRER, S *et al.* Estrogen receptor variant and hypertension in women. *Hypertension*, v. 21, n. 4, p. 439–441, abr. 1993.

LEI, Di *et al.* Long noncoding RNA expression profiling identifies MIR210HG as a novel molecule in severe preeclampsia. *Life Sciences*, v. 270, p. 119121, abr. 2021.

LI, Cui; LIU, Haiyan; DUAN, Zhongliang. Expression of the immune checkpoint molecules CD226 and TIGIT in preeclampsia patients. *BMC Immunology*, v. 25, n. 1, p. 12, 7 fev. 2024.

LI, Hua *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion (ACE I/D) and Angiotensin II Type 1 Receptor (AT1R) Gene Polymorphism and Its Association with Preeclampsia in Chinese Women. *Hypertension in Pregnancy*, v. 26, n. 3, p. 293–301, 7 jan. 2007.

LI, Ziwei *et al.* miR-372-3p promotes preeclampsia progression by regulating twist1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 24, n. 6, p. 723, 19 out. 2022.

LIN, Lifeng; CHU, Haitao. Quantifying Publication Bias in Meta-Analysis. *Biometrics*, v. 74, n. 3, p. 785–794, 1 set. 2018.

LIND, Lars *et al.* Genetic variation in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 gene (*DDAH1*) is related to asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels, but not to endothelium-dependent vasodilation. *Vascular Medicine*, v. 18, n. 4, p. 192–199, 26 ago. 2013.

LIU, Beibei *et al.* Expression and significance of <sc>microRNA</sc> -126 and <sc>VCAM</sc> -1 in placental tissues of women with early-onset preeclampsia.

Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, v. 47, n. 6, p. 2042–2050, 10 jun. 2021.

LOVATTO, P.A. *et al.* Meta-análise em pesquisas científicas: enfoque em metodologias. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. suppl, p. 285–294, jul. 2007.

LU, Tan-Min; LU, Wei; ZHAO, Long-Jun. MicroRNA-137 Affects Proliferation and Migration of Placenta Trophoblast Cells in Preeclampsia by Targeting ERR α . *Reproductive Sciences*, v. 24, n. 1, p. 85–96, 1 jan. 2017.

LUCENA, Flávia Campos *et al.* Longitudinal assessment of D-dimer and plasminogen activator *inhibitor* type-1 plasma levels in pregnant women with risk factors for preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, v. 38, n. 1, p. 58–63, 2 jan. 2019.

LUMBERS, Eugenie R.; PRINGLE, Kirsty G. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 306, n. 2, p. R91–R101, 15 jan. 2014.

LV, Yan *et al.* Roles of microRNAs in preeclampsia. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 2, p. 1052–1061, 6 fev. 2019.

LYKOUDI, Alexandra *et al.* Dysregulated placental microRNAs in Early and Late onset Preeclampsia. *Placenta*, v. 61, p. 24–32, jan. 2018.

MAAS, Renke *et al.* Polymorphisms in the promoter region of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of hypertension. *Pharmacological Research*, v. 60, n. 6, p. 488–493, dez. 2009.

MARRA, Maurizio *et al.* Chronic renal impairment and DDAH2-1151 A/C polymorphism determine ADMA levels in type 2 diabetic subjects. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 28, n. 4, p. 964–971, abr. 2013.

MATHUR, Maya B.; VANDERWEELE, Tyler J. Sensitivity Analysis for Publication Bias in Meta-Analyses. *Journal of the Royal Statistical Society Series C: Applied Statistics*, v. 69, n. 5, p. 1091–1119, 1 nov. 2020.

MATSUYAMA, Hironori; SUZUKI, Hiroshi I. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 1, p. 132, 24 dez. 2019.

MAYNARD, Sharon E. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 5, p. 649–658, 1 mar. 2003.

MCCAIG, D.; LYALL, F. Inhibitors of Heme Oxygenase Reduce Invasion of Human Primary Cytotrophoblast Cells In vitro. *Placenta*, v. 30, n. 6, p. 536–538, jun. 2009.

MEDICA, Igor; KASTRIN, Andrej; PETERLIN, Borut. Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: A meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 131, n. 2, p. 115–126, abr. 2007.

MELLO, Giorgio *et al.* Maternal-Fetal Flow, Negative Events, and Preeclampsia. *Hypertension*, v. 41, n. 4, p. 932–937, abr. 2003.

MENDELSON, Michael E. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The American Journal of Cardiology*, v. 89, n. 12, p. 12–17, jun. 2002.

METZGER, Ingrid F. *et al.* Effects of endothelial nitric oxide synthase tagSNPs haplotypes on nitrite levels in black subjects. *Nitric Oxide*, v. 28, p. 33–38, jan. 2013.

MOHD ISA, Nurul Iffah *et al.* Potential Roles of microRNAs for Assessing Cardiovascular Risk in Pre-Eclampsia-Exposed Postpartum Women and Offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 23, p. 16842, 28 nov. 2023.

MOL, Ben W J *et al.* Pre-eclampsia. *The Lancet*, v. 387, n. 10022, p. 999–1011, mar. 2016.

MOLDENHAUER, Julie S *et al.* The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 189, n. 4, p. 1173–1177, out. 2003.

MOLVAREC, Attila *et al.* Association between Estrogen Receptor .ALPHA. (ESR1) Gene Polymorphisms and Severe Preeclampsia. *Hypertension Research*, v. 30, n. 3, p. 205–211, 2007.

MOMBOULI, Jean-Vivien. ACE Inhibition, Endothelial Function and Coronary Artery Lesions. *Drugs*, v. 54, n. Supplement 5, p. 12–22, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide and the Vascular Endothelium. *The Vascular Endothelium I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 213–254.

MORGAN, Linda *et al.* Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Journal of Hypertension*, v. 17, n. 6, p. 765–768, jun. 1999.

MUNAUT, Carine *et al.* Dysregulated circulating miRNAs in preeclampsia. *Biomedical Reports*, v. 5, n. 6, p. 686–692, dez. 2016.

MUNIZ, Ludmila *et al.* eNOS tag SNP haplotypes in hypertensive disorders of pregnancy. *DNA and Cell Biology*, v. 31, n. 12, p. 1665–1670, dez. 2012.

MURPHY, Sydney R. *et al.* Role of Endothelin in Mediating Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1–Induced Hypertension in Pregnant Rats. *Hypertension*, v. 55, n. 2, p. 394–398, fev. 2010.

MURRAY-RUST, J *et al.* Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nature structural biology*, v. 8, n. 8, p. 679–83, ago. 2001.

MYATT, Leslie; CUI, Xiaolan. Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 122, n. 4, p. 369–382, 10 out. 2004.

NÉMETH, Balázs *et al.* Asymmetric dimethylarginine levels in preeclampsia – Systematic review and meta-analysis. *Placenta*, v. 69, p. 57–63, set. 2018.

NEUFELD, G *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 13, n. 1, p. 9–22, jan. 1999.

NICE – NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE. *Hypertension in pregnancy. NICE clinical guideline 107*. London: RCOG Press, 2011.

NIZYAEVA, N. V. *et al.* Change in OncomicroRNA Expression in the Placenta during Preeclampsia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 165, n. 6, p. 793–797, 23 out. 2018.

NIZYAEVA, N. V. *et al.* Expression of MicroRNA-146a and MicroRNA-155 in Placental Villi in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 163, n. 3, p. 394–399, 27 jul. 2017.

NORTH, R. A. *et al.* Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: development of model in international prospective cohort. *BMJ*, v. 342, n. apr07 4, p. d1875–d1875, 7 abr. 2011.

NUNEMAKER, Craig S. Considerations for Defining Cytokine Dose, Duration, and Milieu That Are Appropriate for Modeling Chronic Low-Grade Inflammation in Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Research*, v. 2016, p. 1–9, 2016.

O'BRIEN, Jacob *et al.* Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, v. 9, 3 ago. 2018.

OKOLI, Chitu; DUARTE, Traduzido por:David Wesley Amado; MATTAR, Revisão técnica e introdução:João. Guia Para Realizar uma Revisão Sistemática de Literatura. *EaD em Foco*, v. 9, n. 1, 3 abr. 2019.

OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase tagSNPs influence the effects of enalapril in essential hypertension. *Nitric Oxide*, v. 55–56, p. 62–69, maio 2016.

OLKOWICZ, Mariola; CHLOPICKI, Stefan; SMOLENSKI, Ryszard T. Perspectives for angiotensin profiling with liquid chromatography/mass spectrometry to evaluate ACE/ACE2 balance in endothelial dysfunction and vascular pathologies. *Pharmacological Reports*, v. 67, n. 4, p. 778–785, ago. 2015.

OUZZANI, Mourad *et al.* Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*, v. 5, n. 1, p. 210, 5 dez. 2016.

PAGE, Matthew J *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, p. n71, 29 mar. 2021.

PALLAVI ARORA *et al.* MicroRNA-22, Specificity protein-1 and Cystathionine β -synthase in early onset Preeclampsia: significance in trophoblast invasion. *BioRxiv*, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2023.03.08.531738>>.

PALM, Fredrik *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 293, n. 6, p. H3227–H3245, dez. 2007.

PASTORE, Mayra *et al.* Estrogen Receptor- α and Estrogen Receptor- β in the Uterine Vascular Endothelium during Pregnancy: Functional Implications for Regulating Uterine Blood Flow. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 30, n. 01, p. 46–61, 23 jan. 2012.

PATERNI, Ilaria *et al.* Estrogen receptor ligands: a patent review update. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 23, n. 10, p. 1247–1271, 29 out. 2013.

PENA, S.D.J. *et al.* DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 42, n. 10, p. 870–876, 11 set. 2009.

PERAÇOLI, Jose C. *et al.* High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 100, n. 2, p. 129–134, dez. 2013.

PEREIRA, Mauricio Gomes; GALVÃO, Taís Freire. Extração, avaliação da qualidade e síntese dos dados para revisão sistemática. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 23, n. 3, p. 577–578, set. 2014.

PERUCCI, Luiza O. *et al.* Soluble Endoglin, Transforming Growth Factor-Beta 1 and Soluble Tumor Necrosis Factor Alpha Receptors in Different Clinical Manifestations of Preeclampsia. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. e97632, 22 maio 2014.

PETER, Inga *et al.* Variation in estrogen-related genes and cross-sectional and longitudinal blood pressure in the Framingham Heart Study. *Journal of Hypertension*, v. 23, n. 12, p. 2193–2200, dez. 2005.

PHIPPS, Elizabeth *et al.* Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 11, n. 6, p. 1102–1113, jun. 2016.

PINHEIRO, Melina B. *et al.* Severe preeclampsia: Are hemostatic and inflammatory parameters associated? *Clinica Chimica Acta*, v. 427, p. 65–70, jan. 2014.

PINHEIRO, Melina B. *et al.* Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine*, v. 62, n. 1, p. 165–173, abr. 2013.

POLLOCK, Alex; BERGE, Eivind. How to do a systematic review. *International Journal of Stroke*, v. 13, n. 2, p. 138–156, 17 fev. 2018.

POPE, Arthur J. *et al.* Role of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolases in the Regulation of Endothelial Nitric Oxide Production. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 51, p. 35338–35347, dez. 2009.

QUILLON, Alfred; FROMY, Bérengère; DEBRET, Romain. Endothelium microenvironment sensing leading to nitric oxide mediated vasodilation: A review of nervous and biomechanical signals. *Nitric Oxide*, v. 45, p. 20–26, fev. 2015.

R, Priyadarshini *et al.* miRNA Associated With Glucose Transporters in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *Cureus*, 27 set. 2023.

RAIJMAKERS, M.T.M. *et al.* NAD(P)H Oxidase Associated Superoxide Production in Human Placenta from Normotensive and Pre-eclamptic Women. *Placenta*, v. 25, p. S85–S89, abr. 2004.

RANA, Sarosh *et al.* Clinical characterization and outcomes of preeclampsia with normal angiogenic profile. *Hypertension in Pregnancy*, v. 32, n. 2, p. 189–201, 31 maio 2013.

RANA, Sarosh; KARUMANCHI, S. Ananth; LINDHEIMER, Marshall D. Angiogenic Factors in Diagnosis, Management, and Research in Preeclampsia. *Hypertension*, v. 63, n. 2, p. 198–202, fev. 2014.

REDMAN, C.W.G.; SARGENT, I.L. Placental Stress and Pre-eclampsia: A Revised View. *Placenta*, v. 30, p. 38–42, mar. 2009.

RIGAT, B *et al.* An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigation*, v. 86, n. 4, p. 1343–1346, 1 out. 1990.

ROBERTS, Candice B *et al.* Hypertension-related gene polymorphisms in pre-eclampsia, eclampsia and gestational hypertension in Black South African women. *Journal of Hypertension*, v. 22, n. 5, p. 945–948, maio 2004.

ROBERTS, James M.; GAMMILL, Hilary S. Preeclampsia. *Hypertension*, v. 46, n. 6, p. 1243–1249, dez. 2005.

ROMERO, Roberto *et al.* A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 21, n. 1, p. 9–23, 7 jan. 2008.

ROSENDAAL, Frits R. Venous Thrombosis: The Role of Genes, Environment, and Behavior. *Hematology*, v. 2005, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2005.

SABEN, J. *et al.* Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. *Placenta*, v. 35, n. 3, p. 171–177, mar. 2014.

SALIMI, Saeedeh *et al.* Association of Angiotensin-Converting Enzyme Intron 16 Insertion/Deletion and Angiotensin II Type 1 Receptor A1166C Gene Polymorphisms with Preeclampsia in South East of Iran. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2011, p. 1–6, 2011.

SALIMINEJAD, Kioomars *et al.* An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 5, p. 5451–5465, 23 maio 2019.

SANDRIM, Valeria 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, ago. 2008.

SANKARALINGAM, Sowndramalingam; XU, Han; DAVIDGE, Sandra 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.

SANTOS, Eduardo; CARDOSO, Daniela; APÓSTOLO, João. Como medir e explorar a heterogeneidade de uma meta-análise: Estratégias metodológicas fundamentais. *Revista de Enfermagem Referência*, v. VI Série, n. Nº 1, 5 ago. 2022.

SCHUIT, Stephanie C. E. Estrogen Receptor α Gene Polymorphisms and Risk of Myocardial Infarction. *JAMA*, v. 291, n. 24, p. 2969, 23 jun. 2004.

SCHUITEMAKER, Joost H.N. *et al.* Changes in endothelial cell specific molecule 1 plasma levels during preeclamptic pregnancies compared to healthy pregnancies. *Pregnancy Hypertension*, v. 12, p. 58–64, abr. 2018.

SCHUNEMANN, H. J *et al.* GRADE: assessing the quality of evidence for diagnostic recommendations. *Evidence-Based Medicine*, v. 13, n. 6, p. 162–163, 1 dez. 2008.

SHAIK, A. P. *et al.* A meta-analysis of eNOS and ACE gene polymorphisms and risk of pre-eclampsia in women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 31, n. 7, p. 603–607, 5 out. 2011.

SHAMSI, Uzma; SALEEM, Sarah; NISHTER, Noureen. Epidemiology and risk factors of preeclampsia; an overview of observational studies. *Al Ameen J Med Sci*, v. 6, n. 4, p. 292–300, 2013.

SHAO, Xuan *et al.* Testosterone Represses Estrogen Signaling by Upregulating miR-22. *Hypertension*, v. 69, n. 4, p. 721–730, abr. 2017.

SHARMA, Dhruvikumari D *et al.* The Management of Preeclampsia: A Comprehensive Review of Current Practices and Future Directions. *Cureus*, 2 jan. 2024.

SHEARMAN, Amanda M. *et al.* Association Between Estrogen Receptor α Gene Variation and Cardiovascular Disease. *JAMA*, v. 290, n. 17, p. 2263, 5 nov. 2003.

SHEIKH, Adam M. *et al.* Systematic Review of Micro-RNA Expression in Pre-Eclampsia Identifies a Number of Common Pathways Associated with the Disease. *PLOS ONE*, v. 11, n. 8, p. e0160808, 16 ago. 2016.

SIDDIQUI, Athar H. *et al.* Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibody Is Highly Prevalent in Preeclampsia. *Hypertension*, v. 55, n. 2, p. 386–393, fev. 2010.

SIRCAR, Monica; THADHANI, Ravi; KARUMANCHI, S. Ananth. Pathogenesis of preeclampsia. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 24, n. 2, p. 131–138, mar. 2015.

SIROEN, Michiel P. C. *et al.* The Clinical Significance of Asymmetric Dimethylarginine. *Annual Review of Nutrition*, v. 26, n. 1, p. 203–228, 1 ago. 2006.

SKJÆRVEN, Rolv; WILCOX, Allen J.; LIE, Rolv T. The Interval between Pregnancies and the Risk of Preeclampsia. *New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 1, p. 33–38, 3 jan. 2002.

SOHLBERG, S. *et al.* Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: A magnetic resonance imaging study. *Placenta*, v. 35, n. 3, p. 202–206, mar. 2014.

SPRADLEY, Frank; PALEI, Ana; GRANGER, Joey. Immune Mechanisms Linking Obesity and Preeclampsia. *Biomolecules*, v. 5, n. 4, p. 3142–3176, 12 nov. 2015.

SPRADLEY, Frank T.; PALEI, Ana C.; GRANGER, Joey P. Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 309, n. 11, p. R1326–R1343, 1 dez. 2015.

STEPAN, H. *et al.* Relation between Circulating Angiotensin II Type 1 Receptor Agonistic Autoantibodies and Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1 in the Pathogenesis

of Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 91, n. 6, p. 2424–2427, jun. 2006.

STERNE, Jonathan A. C.; HARBORD, Roger M. Funnel Plots in Meta-analysis. *The Stata Journal: Promoting communications on statistics and Stata*, v. 4, n. 2, p. 127–141, 1 jun. 2004.

STERNE, Jonathan A.C; EGGER, Matthias. Funnel plots for detecting bias in meta-analysis. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 54, n. 10, p. 1046–1055, out. 2001.

STÜHLINGER, Markus C. *et al.* Homocysteine Impairs the Nitric Oxide Synthase Pathway. *Circulation*, v. 104, n. 21, p. 2569–2575, 20 nov. 2001.

SUEHIRO, Tadashi *et al.* Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA originating from the ACE allele with deletion. *Human Genetics*, v. 115, n. 2, 26 jul. 2004.

SZARKA, András *et al.* Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunology*, v. 11, n. 1, p. 59, 2 dez. 2010.

TAIN, You-Lin; HSU, Chien-Ning. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). *Toxins*, v. 9, n. 3, p. 92, 6 mar. 2017.

TAL, Reshef. The Role of Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1Alpha in Preeclampsia Pathogenesis. *Biology of Reproduction*, v. 87, n. 6, 1 dez. 2012.

TANIKAWA, Lilian Mitsuko; FERREIRA, Sila Mary Rodrigues; RETONDARIO, Anabelle. PROTOCOLO DE REVISÃO DE ESCOPO E REVISÃO SISTEMÁTICA NA ÁREA DE ALIMENTOS. *Visão Acadêmica*, v. 22, n. 2, 2 jun. 2021.

TAYLOR, Robert N. *et al.* Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: Evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 188, n. 1, p. 177–182, jan. 2003.

TEMPFER, Clemens B. *et al.* Polymorphisms of Thrombophilic and Vasoactive Genes and Severe Preeclampsia: A Pilot Study. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, v. 11, n. 4, p. 227–231, 28 maio 2004.

THADHANI, Ravi *et al.* Pilot Study of Extracorporeal Removal of Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 in Preeclampsia. *Circulation*, v. 124, n. 8, p. 940–950, 23 ago. 2011.

TRANQUILLI, A.L. *et al.* The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, v. 4, n. 2, p. 97–104, abr. 2014.

UEDA, Seiji; YAMAGISHI, Sho-Ichi; OKUDA, Seiya. New pathways to renal damage: role of ADMA in retarding renal disease progression. *Journal of nephrology*, v. 23, n. 4, p. 377–86, 2010.

UMAN, Lindsay S. Systematic reviews and meta-analyses. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Académie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent*, v. 20, n. 1, p. 57–9, fev. 2011.

UZAN, Jennifer *et al.* Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vascular Health and Risk Management*, v. 7, p. 467–474, 2011.

VALENSISE, Herbert *et al.* Early and Late Preeclampsia. *Hypertension*, v. 52, n. 5, p. 873–880, nov. 2008.

VALENZUELA, Francisco J. *et al.* Pathogenesis of Preeclampsia: The Genetic Component. *Journal of Pregnancy*, v. 2012, p. 1–8, 2012.

VELLOSO, E.P. *et al.* Reduced plasma levels of angiotensin-(1-7) and renin activity in preeclamptic patients are associated with the angiotensin I- converting enzyme deletion/deletion genotype. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 40, n. 4, p. 583–590, abr. 2007.

VENKATESHA, Shivalingappa *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine*, v. 12, n. 6, p. 642–649, 1 jun. 2006.

VERDONK, Koen *et al.* The renin–angiotensin–aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad. *Clinical Science*, v. 126, n. 8, p. 537–544, 1 abr. 2014.

VIJAYAN, Vinaya *et al.* QUANTIFICATION OF VARIED MIRNAS IN EARLY AND LATE-ONSET PREECLAMPSIA COMPLICATING PREGNANCIES IN SOUTH INDIAN WOMEN-A COHORT STUDY. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 5484 IJPSR*, v. 14, n. 11, p. 5484–5492, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.14>>.

VILLA, Pia M. *et al.* Cluster analysis to estimate the risk of preeclampsia in the high-risk Prediction and Prevention of Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction (PREDO) study. *PLOS ONE*, v. 12, n. 3, p. e0174399, 28 mar. 2017.

VON DADELSZEN, Peter *et al.* Prediction of adverse maternal outcomes in pre-eclampsia: development and validation of the fullPIERS model. *The Lancet*, v. 377, n. 9761, p. 219–227, jan. 2011.

WALLUKAT, Gerd *et al.* Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *Journal of Clinical Investigation*, v. 103, n. 7, p. 945–952, 1 abr. 1999.

WANG, Keqing *et al.* Dysregulation of Hydrogen Sulfide Producing Enzyme Cystathionine γ -lyase Contributes to Maternal Hypertension and Placental Abnormalities in Preeclampsia. *Circulation*, v. 127, n. 25, p. 2514–2522, 25 jun. 2013.

WANG, Keqing *et al.* Response to Letter Regarding Article, “Dysregulation of Hydrogen Sulfide (H_2S) Producing Enzyme Cystathionine γ -lyase (CSE) Contributes to Maternal Hypertension and Placental Abnormalities in Preeclampsia”. *Circulation*, v. 129, n. 22, 3 jun. 2014.

WANG, Ling *et al.* METTL3-mediated lncRNA HOXD-AS1 stability regulates inflammation, and the migration and invasion of trophoblast cells via the miR-135a/ β -TRCP axis. *Non-coding RNA Research*, v. 9, n. 1, p. 12–23, mar. 2024.

WANG, Tao *et al.* Association of the –449GC and –1151AC polymorphisms in the *DDAH2* gene with asymmetric dimethylarginine and erythropoietin resistance in Chinese patients on maintenance hemodialysis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 44, n. 9, p. 961–964, 10 set. 2017.

WANG, Yu *et al.* Regulation of the human placental (pro)renin receptor-prorenin-angiotensin system by microRNAs. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 28 jul. 2018.

WEEDON-FEKJÆR, M.S. *et al.* Placental miR-1301 is dysregulated in early-onset preeclampsia and inversely correlated with maternal circulating leptin. *Placenta*, v. 35, n. 9, p. 709–717, set. 2014.

WEISSGERBER, Tracey L.; MUDD, Lanay M. Preeclampsia and Diabetes. *Current Diabetes Reports*, v. 15, n. 3, p. 9, 3 mar. 2015.

WELLS G *et al.* *The Newcastle- Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta- analyses.*

WHIGHAM, Carole-Anne *et al.* MicroRNAs 363 and 149 are differentially expressed in the maternal circulation preceding a diagnosis of preeclampsia. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 18077, 22 out. 2020.

WILLIAMS, Paula J.; BROUGHTON PIPKIN, Fiona. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 25, n. 4, p. 405–417, ago. 2011.

WINGER, Edward E. *et al.* Peripheral blood cell microRNA quantification during the first trimester predicts preeclampsia: Proof of concept. *PLOS ONE*, v. 13, n. 1, p. e0190654, 2 jan. 2018.

XIA, Yang; KELLEMS, Rodney E. Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibodies and Hypertension. *Circulation Research*, v. 113, n. 1, p. 78–87, 21 jun. 2013.

YANG, Hai-Yan. MiR-133b regulates oxidative stress injury of trophoblasts in preeclampsia by mediating the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Journal of Molecular Histology*, v. 52, n. 6, p. 1177–1188, 8 dez. 2021.

YUAN, Jing *et al.* Circulating asymmetric dimethylarginine and the risk of preeclampsia: a meta-analysis based on 1338 participants. *Oncotarget*, v. 8, n. 27, p. 43944–43952, 4 jul. 2017.

YUKSEL, Mehmet Aytac *et al.* Serum endocan concentration in women with preeclampsia. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 292, n. 1, p. 69–73, 23 jul. 2015.

ZENG, Yachang *et al.* Homocysteine, endothelin-1 and nitric oxide in patients with hypertensive disorders complicating pregnancy. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 8, n. 11, p. 15275–9, 2015.

ZHANG, Hao *et al.* Integrated microarray analysis of key genes and a miRNA-mRNA regulatory network of early-onset preeclampsia. *Molecular Medicine Reports*, v. 22, n. 6, p. 4772–4782, 30 set. 2020.

ZHANG, Juan *et al.* Genotype distribution of estrogen receptor α polymorphisms in pregnant women from healthy and preeclampsia populations and its relation to blood pressure levels. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 47, n. 4, 1 jan. 2009.

ZHAO, H. *et al.* Effect of Heme Oxygenase-1 Deficiency on Placental Development. *Placenta*, v. 30, n. 10, p. 861–868, out. 2009.

ZHONG, W.G. *et al.* Meta analysis of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism as a risk factor for preeclampsia in Chinese women. *Genetics and Molecular Research*, v. 11, n. 3, p. 2268–2276, 2012.

ZHOU, Cissy C *et al.* Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce preeclampsia in pregnant mice. *Nature Medicine*, v. 14, n. 8, p. 855–862, 27 ago. 2008.

ZHOU, Cissy Chenyi *et al.* Angiotensin II Induces Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1 Release via Calcineurin Signaling Pathway in Pregnancy. *Circulation Research*, v. 100, n. 1, p. 88–95, 5 jan. 2007.

ZHOU, Cissy Chenyi *et al.* Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibody–Mediated Tumor Necrosis Factor- α Induction Contributes to Increased Soluble Endoglin Production in Preeclampsia. *Circulation*, v. 121, n. 3, p. 436–444, 26 jan. 2010.

ZHOU, Yan *et al.* Reversal of gene dysregulation in cultured cytotrophoblasts reveals possible causes of preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*, v. 123, n. 7, p. 2862–2872, 1 jul. 2013.

ZHOU, Yan *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Ligands and Receptors That Regulate Human Cytotrophoblast Survival Are Dysregulated in Severe Preeclampsia and Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelets Syndrome. *The American Journal of Pathology*, v. 160, n. 4, p. 1405–1423, abr. 2002.

APÊNDICES

MATERIAL SUPLEMENTAR DO ARTIGO 1: Changes in microRNA expression associated with preeclampsia: a systematic review

A. Search strategy

Pre-Eclampsia OR Pre Eclampsia OR Preeclampsia OR Pregnancy Toxemias OR Pregnancy Toxemia OR Edema Proteinuria Hypertension Gestosis OR Hypertension, Pregnancy-Induced OR hypertension pregnancy OR (high blood pressure AND pregnancy) OR (protein excretion AND pregnancy) OR (proteinuria AND pregnancy) OR HELLP syndrome

AND

MicroRNAs OR MicroRNA OR miRNAs OR Micro RNA OR miRNA

Pubmed

((((((((((((Pre-Eclampsia(Title/Abstract)) OR (Pre Eclampsia(Title/Abstract))) OR (Preeclampsia(Title/Abstract))) OR (Pregnancy Toxemias(Title/Abstract))) OR (Pregnancy Toxemia(Title/Abstract))) OR (Edema Proteinuria Hypertension Gestosis(Title/Abstract))) OR (Hypertension, Pregnancy-Induced(Title/Abstract))) OR (hypertension pregnancy(Title/Abstract))) OR (high blood pressure(Title/Abstract) AND pregnancy(Title/Abstract))) OR (protein excretion(Title/Abstract) AND pregnancy(Title/Abstract))) OR (proteinuria(Title/Abstract) AND pregnancy(Title/Abstract))) OR (toxemia(Title/Abstract))) OR (HELLP syndrome(Title/Abstract))) AND (((((MicroRNAs(Title/Abstract)) OR (MicroRNA(Title/Abstract))) OR (miRNAs(Title/Abstract))) OR (Micro RNA(Title/Abstract))) OR (miRNA(Title/Abstract)))

EMBASE

('pre eclampsia':ab,ti OR preeclampsia:ab,ti OR 'pregnancy toxemias':ab,ti OR 'pregnancy toxemia':ab,ti OR 'edema proteinuria hypertension gestosis':ab,ti OR 'hypertension, pregnancy-induced':ab,ti OR 'hypertension pregnancy':ab,ti OR ('high blood pressure':ab,ti AND pregnancy:ab,ti) OR ('protein excretion':ab,ti AND pregnancy:ab,ti) OR (proteinuria:ab,ti AND pregnancy:ab,ti) OR 'hellp syndrome':ab,ti) AND (micornas:ab,ti OR micorna:ab,ti OR mirnas:ab,ti OR 'micro rna':ab,ti OR mirna:ab,ti)

Web of Science

AB=(Pre-Eclampsia OR Pre Eclampsia OR Preeclampsia OR Pregnancy Toxemias OR Pregnancy Toxemia OR Edema Proteinuria Hypertension Gestosis OR Hypertension, Pregnancy-Induced OR hypertension pregnancy OR (high blood pressure AND pregnancy) OR (protein excretion AND pregnancy) OR (proteinuria AND pregnancy) OR HELLP syndrome) AND AB=(MicroRNAs OR MicroRNA OR miRNAs OR Micro RNA OR miRNA)

LILACS

Title, Abstract, Subject

(Pre-Eclampsia OR Pre Eclampsia OR Preeclampsia OR Pregnancy Toxemias OR Pregnancy Toxemia OR Edema Proteinuria Hypertension Gestosis OR Hypertension, Pregnancy-Induced OR hypertension pregnancy OR (high blood pressure AND pregnancy) OR (protein excretion AND pregnancy) OR (proteinuria AND pregnancy) OR HELLP syndrome) AND (MicroRNAs OR MicroRNA OR miRNAs OR Micro RNA OR miRNA)

B. Supplementary Table 1: Country list

Country	Number of studies
	134 (13,15–17,19–21,24,27,31,35,36,38,39,42–44,52,53,55,57,58,61–64,66,68,69,72,73,75,76,79,81,83,84,87,88,91–96,98,99,101,104,111,114–195)
China	14 (25,28–30,33,70,80,195–201)
USA	7 (12,46,49,60,74,100,202)
Turkey	5 (48,203–206)
Czech Republic	4 (54,82,102,207)
Russia	4 (37,78,208,209)
Germany	4 (105,210–212)
Brazil	4 (45,213–215)
South Korea	4 (10,216–218)
Iran	3 (14,18,86)
Egypt	3 (89,219,220)
Canada	3 (32,221,222)
Hungary	3 (85,223,224)
Mexico	2 (225,226)
India	2 (67,90)
Australia	2 (2,11)
Bahrein	2 (1,71)
Belgium	2 (41,227)
Slovakia	2 (3,103)
Greece	2 (23,56)
Italy	2 (26,50)
Japan	2 (228,229)
Taiwan	

South Africa	1 (51)
Spain	1 (59)
France	1 (230)
The Netherlands	1 (97)
Norway	1 (22)
Pakistan	1 (65)
Serbia	1 (47)
Switzerland	1 (34)
Thailand	1 (77)

C. Supplementary Table 2: Upregulated microRNAs

micro RNA	General	Early	Late	Placenta	Blood	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester
ENSG00000216111	1 (196)	-	-	1 (196)				
let-7a-5p	1 (57)	-	-	-	-	1 (231)		-
let-7b	2 (37,78)	-	-	2 (37,78)	-			2 (37,78)
let-7b*	1 (100)	-	1 (100)	-				1 (100)
let-7c-5p	1 (102)	1 (102)	-	-	1 (102)			1 (102)
let-7f-1*	1 (100)	-	1 (100)	-				1 (100)
miR-1	1 (21)			1 (21)				1 (21)
miR-7f	1 (53)		1 (53)	1 (53)				

miR-10b	1 (26)		1 (26)		
miR-10b-3p	1 (85)			1 (85)	
miR-15a-5p	1 (57)				1 (57)
miR-16	5 (21,53,64-66)	1 (53)	4 (21,53,64,66)	1 (65)	5 (21,53,64-66)
miR-16-5p	1 (227)			1 (227)	
miR-17	1 (80)		1 (80)		1 (80)
miR-17-3p	1 (24)		1 (24)		
miR-18a	1 (26)		1 (26)		
miR-18b-5p	1 (85)			1 (85)	
miR-19a	2 (26,31)		1 (31)	1 (26)	
miR-19b	2 (21,199)		2 (21,199)		1 (21)

miR-19b-1-5p	1 (85)		1 (85)	
miR-19b-3p	1 (85)		1 (85)	
miR-20a	4 (21,26,80,81)		4 (21,26,80,81)	3 (21,80,81)
miR-20b	4 (21,53,79,80)	1 (53)	4 (21,53,79,80)	1 (79) 2 (80,81)
miR-21	2 (2,41)		1 (2)	1 (2) 1 (41)
miR-21-5p	2 (85,227)			2 (85,227) 1 (227)
miR-22	1 (91)	1 (91)	1 (91)	1 (91)
miR-22*	1 (26)		1 (26)	
miR-23a	1 (126)		1 (126)	1 (126)
miR-23a-5p	1 (170)		1 (170)	

miR-23c	1 (100)	1 (100)			1 (100)
miR-24	1 (52)	1 (52)		1 (52)	1 (52)
miR-24-3p	2 (12,177)			1(12)	2 (12,177)
miR-25	2 (23,214)		1 (214)	1 (23)	1 (214)
miR-25-star_s	1 (196)		1 (196)		
miR-26a	2 (52,214)	1 (52)	1 (214)	1 (52)	2 (52,214)
miR-26a-5p	1 (190)		1 (190)		1 (190)
miR-26b	2 (53,214)	1 (53)	2 (53,214)		2 (53,214)
miR-26b-3p	1 (85)			1 (85)	
miR-27a	1 (127)	1 (127)	1 (127)		1 (127)

miR-27a-5p	1 (19)		1 (19)		1 (19)
miR-27b-3p	4 (82–85)	1 (82)		4 (82–85)	2 (82,83)
miR-28-3p	1 (85)			1 (85)	
miR-28-5p	1 (85)			1 (85)	
miR-29a	2 (51,69)			2 (51,69)	2 (51,69)
miR-29a-3p	1 (12)			1 (12)	1 (12)
miR-29b	1 (53)	1 (53)	1 (53)		1 (53)
miR-29b-3p	1 (219)			1 (219)	1 (219)
miR-30a-3p	3 (24,38,141)		3 (24,38,141)		2 (38,141)
miR-30b	1 (157)			1 (157)	1 (157)
miR-30d	1 (52)	1 (52)		1 (52)	

miR-30e	1 (53)	1 (53)	1 (53)	
miR-30e-3p	1 (85)			1 (85)
miR-31	2 (24,45)		1 (24)	1 (45)
miR-31-5p	3 (19,213,215)		1 (215)	2 (19,24) 1 (19)
miR-32	1 (23)			1 (23)
miR-33b-3p	1 (89)	1 (89)	1 (89)	1 (89)
miR-34a	1(230)		1 (230)	
miR-34a	2 (142,145)		2 (142,145)	2 (142,145)
miR-34a-3p	1 (85)			1 (85) 1 (85)
miR-34a-5p	1 (231)		1 (231)	

miR-92a-1-3p	1 (57)		1 (57)	
miR-92b	1 (214)		1 (214)	1 (214)
miR-92b-3p	1 (82)	1 (82)	1 (82)	
miR-95	1 (214)		1 (214)	1 (214)
miR-95-5p	1 (153)		1 (153)	1 (153)
miR-98-5p	1 (219)		1 (219)	1 (219)
miR-103	1 (52)	1 (52)	1 (52)	1 (52)
miR-104	2 (37,78)		2 (37,78)	2 (37,78)
miR-106a	3 (21,57,199)		2 (21,199)	1 (21)
miR-122	1 (41)		1 (41)	1 (41)
miR-122-5p	1 (144)		1 (144)	

miR-124*	1 (3)	1 (3)	1 (3)	1 (3)
miR-124-3p	1 (124)		1 (124)	1 (124)
miR-125b	6 (55-60)	2 (58, 59)	1 (60)	3 (55,59,60)
miR-125b-1-3p	2 (21,148)		2 (21,148)	2 (21,148)
miR-126	1 (87)	1 (87)	1 (87)	1 (87)
miR-126*	1 (26)		1 (26)	
miR-126-3p	2 (85,101)		1 (101)	1 (85)
miR-126-5p	1 (85)			1 (85)
miR-128-3p	1 (186)		1 (186)	1 (186)
miR-128a	2 (37,78)		2 (37,78)	2 (37,78)

miR-130a	1 (52)	1 (52)		1 (52)		1 (52)
miR-130a-3p	1 (57)					1 (57)
miR-130b	2 (3,52)	1 (3)	1 (52)	1 (3)	1 (52)	2 (3,52)
miR-132-3p	1 (12)				1 (12)	1 (12)
miR-133b	3 (37,78,93)	1 (93)		3 (37,78,93)		3 (37,78,93)
miR-137	1 (92)	1 (92)	1 (92)	1 (92)		
miR-138	1 (208)			1 (208)		1 (208)
miR-141	3 (69,209,229)	1 (209)		1 (209)	2 (69,229)	3 (69,209,229)
miR-141-3p	1 (158)			1 (158)	1 (158)	
miR-142-3p	1 (85)			1 (85)	1 (85)	

miR-142-5p	1 (85)			1 (85)	
miR-143	1 (59)	1 (59)			1 (59)
miR-144*	1 (26)		1 (26)		
miR-144-5p	1 (85)			1 (85)	
miR-145	1 (52)	1 (52)		1 (52)	1 (52)
miR-145-5p	1 (101)	1 (101)	1 (101)		1 (101)
miR-146-5p	1 (226)		1 (226)		
miR-146a	1 (151)		1 (151)		1 (151)
miR-146a-5p	1 (85)			1 (85)	
miR-146b-5p	2 (26,85)		1 (26)	1 (85)	

miR-148a-3p	1 (19)		1 (19)		1 (19)
miR-151	1 (24)		1 (24)		
miR-151-3p	1 (52)	1 (52)		1 (52)	1 (52)
miR-151a-3p	1 (85)			1 (85)	
miR-151a-5p	1 (85)			1 (85)	
miR-152	3 (20,23,38)		1 (38)	2 (20,23)	2 (20,23)
miR-154*	1 (38)		1 (38)		1 (38)
miR-155	12 (2,3,10,14,17,30,39,42,44)	2 (17,227)	1 (43)	7 (3,30,39-42,44)	10(3,10,14,17,30,42,219,227)
miR-155	4 (215,217,219,227)		1 (217)	3 (215,219,227)	3 (215,219,227)

miR-181a	7 (21,24,38,51-54)	3 (52,53,89)	5 (21,38,53,89,136,164)	1 (52)	5 (21,24,51-53)
miR-181a-2-3p	1 (89)	1 (89)	1 (89)		1 (89)
miR-181a-5p	4 (82,136,164,219)	1 (82)	2 (136,164)	2 (136,164)	3 (136,164,219)
miR-181b	1 (30)		1 (30)		1 (30)
miR-182	3 (20,21,30)		2 (21,30)	1 (20)	3 (20,21,30)
miR-182*	4 (25,37,78)		4 (25,37,78)		4 (25,37,78)
miR-182-5p	2 (119,135)		2 (119,135)		
miR-183	5 (20,30,61-63)		4 (30,61-63)	1 (20)	3 (20,30,63)
miR-185	1 (26)		1 (26)		

miR-186-5p	2 (82,85)	1 (82)	2 (82,85)	
miR-187-5p	1 (226)		1 (226)	
miR-191	1 (214)		1 (214)	1 (214)
miR-191-5p	1 (57)			1 (57)
miR-192	1 (59)	1 (59)	1 (59)	1 (59)
miR-193a-3p	1 (23)		1 (23)	
miR-193b	1 (24)		1 (24)	
miR-193b*	1 (26)		1 (26)	
miR-193b_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-193b-3p	1 (19)		1 (19)	1 (19)

miR-193b-5p	2 (101,169)	1 (101)	1 (101)	1(169)	
miR-195	1 (53)	1 (53)	1 (53)		1 (53)
miR-196b-5p	1 (207)			1 (207)	1 (207)
miR-197	1 (214)		1 (214)		1 (214)
miR-197-3p	1 (12)			1 (12)	1 (12)
miR-198	1 (214)		1 (214)		1 (214)
miR-199a-3p	1 (85)			1 (85)	
miR-200a	1 (229)			1 (229)	1 (229)
miR-200a-3p	1 (158)		1 (158)	1 (158)	
miR-200b	1 (30)		1 (30)		1 (30)
miR-200c	2 (71,81)	1 (71)	1 (81)	1 (71)	2 (71,81)

miR-202	1 (214)			1 (214)				1 (214)
miR-202-3p_st	1 (196)			1 (196)				
miR-202-5p	1 (179)			1 (179)				1 (179)
miR-203	1 (140)			1 (140)				1 (140)
miR-204	2 (23,214)			1 (214)	1 (23)			1 (214)
miR-204-5p	1 (105)				1 (105)		1 (105)	
miR-206	1 (128)				1 (128)			
miR-206-5p	1 (207)				1 (207)			1 (207)
miR-210	30 (2,10-35,38,198)	1 (17)	1 (22)	19 (13,15,16,18,19,21,22,24-26,28-30,32-35,38,89)	12 (2,10-12,14,17,20,23,27,31,198,219)			22 (10-15,17-22,25,27-30,32-35,38)

miR-210-3p	3 (1,216,219)		3 (1,216,219)		2 (216,219)
miR-210-5p	2 (1,89)	1 (89)	1 (89)	1(1)	1 (89)
miR-214-3p	1 (215)			1 (215)	
miR-215	2 (2,23)			2 (2,23)	
miR-215-5p	1 (129)		1 (129)		1 (129)
miR-218	1 (143)		1 (143)		
miR-218-5p	2 (12,194)		2 (12,194)		
miR-221	2 (52,69)	1 (52)		2 (52,69)	2 (52,69)
miR-221-3p	1 (85)			1 (85)	
miR-222	1 (53)	1 (53)	1 (53)		1 (53)

miR-222-3p	1 (219)		1 (219)	1 (219)
miR-296	2 (24,38)		2 (24,38)	1 (38)
miR-296-3p	3 (29,214,219)		2 (29,214) 1 (219)	3 (29,214,219)
miR-296-5p	3 (23,101,214)	1 (101)	2 (101,214)	2 (101,214)
miR-299	1 (165)		1 (165)	1 (165)
miR-299-5p	1 (144)		1 (144)	
miR-300	1 (115)		1 (115) 1 (115)	
miR-302*	2 (37,78)		2 (37,78)	2 (37,78)
miR-302a	1 (172)		1 (172)	1 (172)
miR-302c-3p	1 (85)		1 (85)	

miR-320a	1 (172)	1 (172)	1 (172)	1 (172)
miR-323a-3p	1 (85)		1 (85)	
miR-326	1 (85)	1 (85)		
miR-328	1 (12)		1 (12)	1 (12)
miR-330-5p	1 (178)	1 (178)	1 (178)	1 (178)
miR-335	2 (53,168)	1 (53)	2 (53,168)	1 (53)
miR-342-3p	3 (52,159,214)	1 (52)	2 (159,214)	3 (52,159,214)
miR-346	2 (184,228)		2 (184,228)	1 (228) (184,228)
miR-355	1 (21)		1 (21)	1 (21)
miR-361-5p	1 (85)		1 (85)	
miR-362	2 (24,38)	2 (24,38)		1 (38)

miR-365a-3p	1 (19)		1 (19)		1 (19)
miR-367*	1 (88)	1 (88)	1 (88)		1 (88)
miR-371a-5p	1 (101)	1 (101)	1 (101)		1 (101)
miR-374a-5p	2 (57,85)		1 (85)	1 (57)	
miR-375	1 (12)		1 (12)		1 (12)
miR-376c	1 (132)		1 (132)	1 (132)	1 (132)
miR-377	1 (29)		1 (29)		1 (29)
miR-378a-3p	1 (85)		1 (85)		
miR-378c	1 (90)	1 (90)	1 (90)		1 (90)
miR-383	1 (3)	1 (3)	1 (3)		1 (3)
miR-411-5p	1 (85)		1 (85)		

miR-422a	1 (85)		1 (85)	
miR-423-3p	1 (3)	1 (3)	1 (3)	1 (3)
miR-423-5p	1 (102)	1 (102)	1 (102)	1 (102)
miR-424	1 (21)		1 (21)	1 (21)
miR-425	1 (52)	1 (52)	1 (52)	1 (52)
miR-425*	1 (100)	1 (100)		1 (100)
miR-431	2 (3,163)	1 (3)	2 (3,163)	2 (3,163)
miR-432-3p	1 (85)		1 (85)	
miR-441	1 (132)		1 (132)	1 (132)
miR-450a	1 (53)	1 (53)	1 (53)	
miR-451	1 (26)	1 (26)	1 (26)	

miR-451a	1 (144)		1 (144)	
miR-451_s t	1 (196)		1 (196)	
miR-452	1 (86)	1 (86)	1 (86)	
miR-483-5p	1 (29)		1 (29)	1 (29)
miR-486-3p	1 (53)	1 (53)	1 (53)	
miR-490-3p	1 (85)		1 (85)	
miR-491-5p	1 (122)		1 (122)	
miR-494	1 (10)		1 (10)	1 (10)
miR-499a-5p	1 (204)		1 (204)	1 (204)
miR-500a	1 (3)		1 (3)	1 (3)

miR-502-5p	1 (207)		1 (207)	1 (207)
miR-503-5p	1 (207)		1 (207)	1 (207)
miR-507	1 (192)		1 (192)	
miR-510	1 (225)		1 (225)	
miR-512-3p	3 (85,101,224)		1 (101)	2 (85,224) 1 (101)
miR-513c-5p	1 (101)	1 (101)	1 (101)	1 (101)
miR-514b-3p	1 (90)	1 (90)	1 (90)	1 (90)
miR-515-3p	1 (24)		1 (24)	
miR-515-5p	1 (50)		1 (50)	1 (50)
miR-516-5	1 (206)		1 (206)	

miR- 516a- 5p	2 (50,80)		1 (80)	1 (50)		2 (50,80)
miR- 516b	1 (50)			1 (50)		1 (50)
miR- 516b- 5p	1 (19)		1 (19)			1 (19)
miR- 517	1 (32)		1 (32)			1 (32)
miR- 517* 5p	2 (38,206)		1 (206)	1 (38)		1 (38)
miR- 517- 5p	2 (48,134)		1 (48)	1 (134)	1 (48)	
miR- 517a/ b	1 (197)		1 (197)			1 (197)
miR- 517c	2 (26,197)		2 (26,197)			1 (197)
miR- 517c- 3p	1 (216)			1 (216)		1 (216)
miR- 518a- 5p	1 (3)	1 (3)	1 (3)			1 (3)

miR-518b	8 (23,24,38, ,46–50)	2 (46, 49)	1 (47)	6 (23,46– 50)	2 (24,38)	1 (23)	3 (38,46,50)
miR-518c	1 (26)			1 (26)			
miR-518f	1 (224)				1 (224)		
miR-518f*	1 (26)			1 (26)			
miR-518f-3p	1 (231)				1 (231)		
miR-519a	1 (54)	1 (54)		1 (54)			
miR-519a-3p	1 (102)	1 (10 2) 2)	1 (102)		1 (102)		1 (102)
miR-519b-3p	1 (53)		1 (53)	1 (53)			
miR-519d	1 (50)				1 (50)		1 (50)
miR-519d-3p	1 (146)						1 (231)

miR-519e*	3 (24,26,38)		3 (24,26,38)		1 (38)
miR-520h	1 (48)		1 (48)	1 (48)	1 (48)
miR-520a	1 (23)		1 (23)		
miR-520a*	1 (26)		1 (26)		
miR-520a-3p	1 (26)		1 (26)		
miR-520a-5p	2 (19,50)		1 (19)	1 (48)	2 (19,50)
miR-520c-3p	2 (85,224)			2	
miR-520d-3p	2 (85,224)			2 (85,224)	
miR-520g	1 (166)	1 (166)	1 (166)	1 (166)	
miR-520h	1 (48)			1 (48)	

miR-522	1 (53)	1 (53)	1 (53)
miR-524	1 (24)	1 (24)	1 (24)
miR-524-3p	1 (80)	1 (80)	
miR-525	1 (205)	1 (205)	
miR-525*	1 (24)	1 (24)	1 (24)
miR-525-5p	2 (50,120)	1 (50)	1 (120)
miR-526a	1 (206)	1 (206)	
miR-526b	1 (50)	1 (50)	1 (50)
miR-526b*	1 (26)	1 (26)	
miR-548aj_st	1 (196)	1 (196)	
miR-565	1 (53)	1 (53)	1 (53)
miR-572	1 (85)	1 (85)	

miR-573	1 (85)			1 (85)		
miR-574	1 (57)			1 (57)		1 (57)
miR-574-5p	4 (1,52,57,97)	1 (97)	1 (52)	3 (1,52,97)	1 (57)	2 (52,97)
miR-582-3p	1 (228)			1 (228)		1 (228)
miR-584	3 (24,38,168)			3 (24,38,168)		1 (38)
miR-584-5p	1 (85)			1 (85)		
miR-590-5p	1 (85)			1 (85)	1 (85)	
miR-601	1 (85)				1 (85)	
miR-628-3p	2 (85,223)				2 (85,223)	
miR-628-5p	2 (85,223)				2 (85,223)	

miR-629-5p	1 (102)	1 (102)	1 (102)
miR-638	2 (24,38)	2 (24,38)	1 (38)
miR-650	2 (2,23)	2 (2,23)	
miR-655-3p	1 (123)	1 (123)	
miR-663	1 (90)	1 (90)	1 (90)
miR-664a-3p	1 (85)	1 (85)	
miR-758-3p	1 (207)	1 (207)	1 (207)
miR-766-3p	1 (85)	1 (85)	
miR-875-5p	1 (85)	1 (85)	
miR-885-5p	1 (210)	1 (210)	1 (210)

miR-892b	1 (85)		1 (85)	
miR-892c-3p	1 (90)	1 (90)	1 (90)	1 (90)
miR-1183	2 (3,100)	2 (3,100)	2 (3,100)	2 (3,100)
miR-1233	1 (23)		1 (23)	
miR-1233-3p	1 (1)		1 (1)	
miR-1247-5p	1 (85)		1 (85)	
miR-1299	1 (144)		1 (144)	
miR-1304-5p	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-1305	1 (50)	1 (50)		1 (50)
miR-1323	1 (50)		1 (50)	1 (50)
miR-1469	1 (21)	1 (21)		1 (21)

miR-1972	1 (97)	1 (97)	1 (97)	1 (97)
miR-2277	1 (80)		1 (80)	1 (80)
miR-4793-3p	1 (97)	1 (97)	1 (97)	1 (97)
miR-5002-5p	1 (104)		1 (104)	1 (104)

D. Supplementary Table 3: Downregulated microRNAs

microRNA	General	Early	Late	Placenta	Blood	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester
ebv-miR-BART1-5p	1 (104)	-	-	-	1 (104)	1 (104)		
hiv1-miR-TAR-3p	1 (104)				1 (104)	1 (104)		
Let-7a-5p	1 (212)				1 (212)			1 (212)
let-7c-5p	1 (102)	1 (102)	1 (102)	1 (102)				1 (102)
let-7f_st	1 (25)			1 (25)				1 (25)
let-7i	1 (167)			1 (167)				1 (167)
miR-1	3 (28,38,60)		1 (60)	3 (28,38,60)				3 (28,38,60)
miR-7_st	1 (25)			1 (25)				1 (25)
miR-10b	1 (38)			1 (38)				1 (38)
miR-15a-3p	1 (144)				1 (144)			
miR-15b	1 (23)				1 (23)			

		2	1		3	3
miR-16	3 (52,67,71)	(67,71)	(52)		(52,67,71)	(52,67,71)
		1))		1))
miR-16-5p	1 (219)				1 (219)	1 (219)
miR-17-5p	1 (12)				1 (12)	1 (12)
miR-18a	4 (2,24,38,67)	1 (67)		2 (24,38)	4 (2,24,38,67)	2 (38,67)
miR-18b	4 (21,38,72,85)			4 (21,38,72,85)		4 (21,38,72,85)
miR-19a	2 (24,38)			2 (24,38)		1 (38)
miR-19a-3p	2 (137,210)			1 (137)	1 (210)	1 (210)
miR-19b	1 (21)			1 (21)		1 (21)
miR-19b1	2 (2,24)				2 (2,24)	
miR-19b-3p	1 (210)				1 (210)	1 (210)
miR-20a-star_st	1 (25)			1 (25)		1 (25)
miR-21	2 (98,214)		1 (98)	1 (214)	1 (98)	
)			
miR-21-3p	1 (202)				1 (202)	1 (202)

miR-22-5p	1 (57)			1 (57)
miR-23a*	1 (207)			1 (207)
miR-23b-5p	1 (103)		1 (103)	1 (103)
miR-24-1-star_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-26b_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-27b-3p	1 (85)	1 (85)	1 (85)	1 (85)
miR-29a-3p	1 (21)		1 (21)	1 (21)
miR-29b	1 (10)		1 (10)	1 (10)
miR-29c-star_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-30d-star_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-31	1 (98)	1 (98)		1 (98)
miR-31-3p	1 (144)			1 (144)
miR-32	1 (38)		1 (38)	1 (38)

miR-34c-5p	2 (28,80)		2 (28,80)		2 (28,80)
miR-92a	1 (21)		1 (21)		1 (21)
miR-92a1	1 (24)			1 (24)	
miR-92a-2-5p	1 (104)			1 (104)	1 (104)
miR-93-5p	1 (57)				1 (57)
miR-99b-5p	1 (103)		1 (103)		
		1 (103)			
miR-100-5p	1 (203)			1 (203)	
miR-101	2 (38,187)		2 (38,187)		2 (38,187)
miR-101_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-107	1 (104)			1 (104)	1 (104)
miR-125a-5p	1 (17)		1 (17)		1 (17)
		1 (17)			
miR-125b	1 (60)		1 (60)		1 (60)
		1 (60)			
miR-125b-5p	1 (203)			1 (203)	

miR-126	3 (23,31,147)		1 (147)	2 (31,147)	
miR-126#	1 (59)	1 (59)		1 (59)	1 (59)
miR-126*	2 (3,38)		2 (3,38)		2 (3,38)
miR-126-3p	2 (57,150)		1 (150)		1 (57) 1 (150)
miR-127	1 (59)	1 (59)		1 (59)	1 (59)
miR-127-3p	1 (102)	1 (102)	1 (102)	1 (102)	1 (102)
miR-128_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-133a	1 (106)			1 (106)	1 (106)
miR-133a-3p	1 (85)			1 (85)	
miR-134-5p	1 (111)		1 (111)		1 (111)
miR-135	1 (116)		1 (116)		1 (116)
miR-135a-5p	1 (193)		1 (193)		1 (193)
miR-135b-5p	1 (19)		1 (19)		1 (19)

miR-136-3p	1 (19)		1 (19)		1 (19)
miR-137_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-138-5p	1 (118)		1 (118)		
miR-139-5p	2 (28,191)		2 (28,191)		2 (28,191)
miR-140-5p	1 (95)	1 (95)	1 (95)		
miR-140-5p_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-141-5p	1 (188)		1 (188)		1 (188)
miR-144	5 (23,38,52,68,69)	1 (52)	2 (38,68)	3 (23,52,69)	3 (52,68,69)
miR-145	1 (161)				
miR-145-5p	1 (130)		1 (130)		1 (130)
miR-145-star_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-146-5p	1 (226)		1 (226)	1 (226)	
miR-146a	2 (40,80)	1 (40)	2 (40,80)		2 (40,80)

miR-148a	1 (114)		1 (114)		1 (114)
miR-148b*	1 (88)	1 (88)			1 (88)
miR-149	2 (67,70)	2 (67,70)	1 (117)	1 (67)	2 (67,70)
miR-149-5p	2 (117,156)		2 (117,156)		2 (117,156)
miR-150	1 (38)		1 (38)		1 (38)
miR-151-3p	1 (80)		1 (80)		
miR-154*	1 (38)		1 (38)		1 (38)
miR-155	1 (40)	1 (40)	1 (40)		1 (40)
miR-155-5p	1 (202)			1 (202)	1 (202)
miR-181a	1 (54)	1 (54)	1 (54)		
miR-186-5p	1 (82)	1 (82)	1 (82)		
miR-187-5p	1 (226)		1 (226)	1 (226)	
miR-188-3p	1 (104)			1 (104)	1 (104)

miR-191-5p	1 (12)			1 (12)		1 (12)
miR-192	1 (80)			1 (80)		1 (80)
miR-192_st	1 (25)			1 (25)		
miR-194	1 (70)			1 (70)		
pri-miR-195	1 (75)			1 (75)		1 (75)
miR-195	5 (24,38,74-76)	1 (76)	1 (74)	3 (24,38,75)	2 (74,76)	3 (38,74,75)
miR-196a_st	1 (25)			1 (25)		1 (25)
miR-196a-5p	1 (154)			1 (154)		
miR-196b	1 (211)			1 (211)		1 (211)
miR-196b_st	1 (25)			1 (25)		1 (25)
miR-197-3p	1 (85)			1 (85)		
miR-199b-5p_st	1 (25)			1 (25)		1 (25)
miR-200c	2 (21,29)			2 (21,29)		2 (21,29)

miR-203a-3p	1 (104)		1 (104)	1 (104)	
miR-204	2 (23,38)		1 (231)	1 (231)	1 (57)
miR-204-3p	1 (57)			1 (57)	
miR-206	1 (106)		1 (106)		1 (106)
miR-210	1 (77)		1 (77)		1 (77)
miR-211-5p	1 (104)		1 (104)	1 (104)	
miR-214	2 (24,53)	1 (53)	2 (24,53)		1 (53)
miR-214-star_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-218	2 (38,220)		2 (38,220)		
miR-218_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-218-5p	1 (220)		1 (220)		1 (220)
miR-221	1 (59)	1 (59)		1 (59)	1 (59)
miR-221-3p	1 (189)		1 (189)		1 (189)

miR-221-star_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-222	1 (51)			1 (51)	1 (51)
miR-222-5p	1 (121)		1 (121)		
miR-223	3 (24,38,214)		3 (24,38,214)		1 (38)
miR-223_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-223-3p	1 (22)	1 (22)	1 (22)		1 (22)
miR-224	1 (26)		1 (26)		
miR-224_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-224-5p	1 (22)	1 (22)	1 (22)		1 (22)
miR-302b-3p	1 (12)			1 (12)	1 (12)
miR-320a	1 (131)		1 (131)		1 (131)
mir-320b-1_x_st	1 (196)		1 (196)		
miR-325	2 (221,222)		2 (221,222)		

miR-328	1 (222)		1 (222)		1 (222)
miR-329_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-335	2 (21,23)		1 (21)	1 (23)	1 (21)
miR-345-3p	1 (175)			1 (175)	1 (175)
miR-346	1 (228)		1 (228)		1 (228)
miR-363	4 (21,24,38,67)	1 (67)	2 (21,38)	1 (67)	3 (21,38,67)
miR-363_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-365a-3p	1 (57)			1 (57)	1 (57)
miR-369-3p	1 (104)				1 (104)
miR-374	1 (38)		1 (38)		1 (38)
miR-376a	1 (23)		1 (23)	1 (23)	
miR-376c	1 (138)			1 (138)	1 (138)
miR-376c-3p	1 (210)			1 (210)	1 (210)

miR-377	1 (38)		1 (38)		1 (38)
miR-379	1 (24)		1 (24)		
miR-383	1 (66)		1 (66)		1 (66)
miR-411	2 (24,38)		2 (24,38)		1 (38)
miR-411-star_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-423-5p	3 (53,102,183)	1 (102)	1 (53)	3 (53,102,183)	2 (53,102)
miR-424	2 (67,195)		1 (195)	1 (67)	2 (67,195)
miR-424-3p	1 (104)			1 (104)	1 (104)
miR-424-5p	1 (185)		1 (185)		
miR-432-star_st	1 (196)		1 (196)		
miR-450	1 (38)		1 (38)		1 (38)
miR-454	2 (139,162)		2 (139,162)		2 (139,162)
miR-454_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)

miR-455-3p	1 (34)		1 (34)		1 (34)
miR-455-5p	1 (34)		1 (34)		1 (34)
miR-483	1 (125)	1 (125)	1 (125)	1 (125)	1 (125)
miR-489_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-491-5p	1 (53)	1 (53)	1 (53)		1 (53)
miR-493-star_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-500	1 (28)		1 (28)		1 (28)
miR-502-5p_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-505_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-506-5p	1 (104)			1 (104)	1 (104)
miR-508-5p	1 (53)	1 (53)	1 (53)		1 (53)
miR-515-3p	1 (200)		1 (200)		1 (200)
miR-515-5p	2 (200,205)		2 (200,205)		2 (200,205)

miR-516a-5p	1 (200)		1 (200)		1 (200)
miR-517-5p	1 (205)		1 (205)		1 (205)
miR-517a/b	1 (218)		1 (218)		1 (218)
miR-518b	2 (200,205)		2 (200,205)		2 (200,205)
miR-518f	1 (200)		1 (200)		1 (200)
miR-518f-5p	1 (205)		1 (205)		1 (205)
miR-519a	1 (205)		1 (205)		1 (205)
miR-519a-3p	1 (102)	1 (102)	1 (102)	1 (102)	1 (102)
miR-519c-3p	2 (25,200)		1 (25,200)		1 (25,200)
miR-519c-3p_st	1 (25)		1 (25)		1 (25)
miR-519d	2 (171,205)		2 (171,205)		2 (171,205)
miR-519e-5p	2 (200)		1 (200)		1 (200)

miR-520a-3p	1 (94)	1 (94)	1 (94)	1 (94)
miR-520a-5p	2 (200,205)		2 (200,205)	2 (200,205)
miR-520b_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-520c-3p_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-520d-5p	1 (200)		1 (200)	1 (200)
miR-520f_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-520h	1 (205)		1 (205)	1 (205)
miR-524-5p	2 (200,205)		2 (200,205)	2 (200,205)
miR-525	1 (205)		1 (205)	1 (205)
miR-525-5p	1 (120)		1 (120)	1 (120)
miR-526a	1 (205)		1 (205)	1 (205)
miR-532-3p	2 (53,183)	1 (53)	2 (53,183)	1 (53)

miR-532-5p	1 (102)	1 (10 2)	1 (102)	1 (102)
miR-539-5p	1 (102)	1 (102)	1 (102)	1 (102)
miR-542-3p	2 (24,38)		2 (24,38)	1 (38)
miR-542-3p_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-544	1 (3)	1 (3)	1 (3)	1 (3)
miR-551b_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-558	3 (176,180,182)		3 (176,180,182)	1 (176)
miR-559-5p	1 (57)		1 (57)	
miR-584	2 (21,28)		2 (21,28)	2 (21,28)
miR-585_st	1 (25)		1 (25)	1 (25)
miR-590	2 (24,38)		2 (24,38)	1 (38)
miR-612	1 (53)	1 (53)	1 (53)	1 (53)
miR-625	1 (38)		1 (38)	1 (38)

miR-629-5p	1 (102)	1 (102)	1 (102)	1 (102)	1 (102)
miR-642b-3p	1 (104)			1 (104)	1 (104)
miR-652-3p	1 (16)		1 (16)		
miR-658	1 (53)		1 (53)		1 (53)
miR-668	1 (23)			1 (23)	
miR-744	1 (21)		1 (21)		1 (21)
miR-762	1 (149)		1 (149)		1 (149)
miR-892b	1 (104)			1 (104)	1 (104)
miR-933_st	1 (196)		1 (196)		
miR-937	1 (88)	1 (88)	1 (88)		1 (88)
miR-942	2 (59,99)	1 (59)		2 (59,99)	1 (59) 1 (99)
miR-942-5p	1 (181)		1 (181)		
miR-1247	1 (28)		1 (28)		1 (28)

miR-1273c	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-1283	1 (67)		1 (67)	1 (67)
miR-1290-3p	1 (215)		1 (215)	
miR-1301	1 (22)	1 (22)	1 (22)	1 (22)
miR-1826	1 (21)		1 (21)	1 (21)
miR-2392	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-3064-5p	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-3171	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-3184-5p	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-3649	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-3907	1 (88)	1 (88)	1 (88)	1 (88)
miR-3935	1 (174)			1 (174)
miR-3942	1 (3)	1 (3)	1 (3)	1 (3)

miR-4264-5p	1 (57)		1 (57)	
miR-4329	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-4432	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-4482-3p	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-4498	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-4701-3p_st	1 (196)	1 (196)		
miR-4752	1 (144)		1 (144)	
miR-4758-5p	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-4785	1 (144)		1 (144)	
miR-5000-5p	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-5009-3p	1 (104)		1 (104)	1 (104)
miR-5582-3p	1 (104)		1 (104)	1 (104)

E. Supplementary Table 4: Studies included in the systematic review

Authors	Reference	Methodological design	Biological sample	Analyzed miRNAs	Upregulated microRNAs	Downregulated microRNAs
Pineles et al 2007	(30)	Cross-sectional, case-control study	Placenta	157 miRNAs	miR-182	NA
					miR-210	
					miR-210	
					miR-155	
					miR-181b	
					miR-182*	
					miR-200b	
miR-154*						
miR-183						
Hu et al 2009	(53)	Case control	Placenta	miR-181a	miR-16	miR-214
				miR-195	miR-29b	miR-658
				miR-222	miR-195	miR-532-3p
				miR-16	miR-26b	miR-423-5p
				miR-29b	miR-181a	miR-491-5p
				miR-26b	miR-335	miR-612
miR-335	miR-222	miR-508-5p				
Zhu et al 2009	(38)	Case control	Placenta	miR-210	miR-181a	miR-101
				miR-152	miR-584	miR-10b
				miR-411	miR-30a-3p	miR-218
				miR-377	miR-210	miR-590
				miR-518b	miR-152	miR-204
miR-18a	miR-517*	miR-32				

				miR-363	miR-518b	0.503
				miR-542-3p	miR-519e*	miR-126*
					miR-638	0.522
					miR-296	miR-18a
					miR-362	0.437
						miR-19a
						0.488
						miR-411
						miR-377
						miR-154*
						miR-625
						miR-144
						miR-195
						miR-150
						miR-1
						miR-18b
						miR-363
						miR-542-3p
						miR-450
						miR-223
						miR-374
						0.349
Lazar et al 2010	(222)	Case control	Placenta	miRNA-325	NA	miR-325

Noack et al 2010	(37)	Case control	Placenta	162 miRNAs	let-7b miR-302* miR-104 miR-128a miR-182* miR-133b	NA
Zhang et al 2010	(44)	Case control	Placenta	miR-155	miR-155	NA
Enquobahrie et al 2011	(28)	Cohort/case control	Placenta	hsa-miR-518c hsa-miR-1 hsa-miR-103 hsa-miR-15a hsa-miR-584 hsa-miR-324-5p hsa-miR-200b hsa-miR-210 hsa-miR-154	miR-210	miR-328 miR-584 miR-139-5p miR-500 miR-1247 miR-34c-5p miR-1
Mayor-Lynn K et al 2011	(29)	Cohort	Placenta	820 miRNAs miR-15b miR-181a miR-200C miR-210	miR-296-3p miR-483-5p miR-377 miR-210	miR-200c

				miR-296-3p		
				miR-377		
				miR-483-5p		
				miR-493		
				let-7b	let-7b	
				miR-302*	miR-302*	
Noack et al 2011	(78)	Case control	Placenta	miR-104	miR-104	NA
				miR-128a	miR-128a	
				miR-182*	miR-182*	
				miR-133b	miR-133b	
Bai et al 2012	(75)	Case control	Placenta	pri-miR-195	NA	pri-miR-195
				miR-195		miR-195
					miR-210	
					miR-193b	
					miR-144*	
					miR-193b*	
					miR-18a	
					miR-185	
Ishibashi et al 2012	(26)	Case control	Placenta	Table 1	miR-19a	miR-224
					miR-590-5p	
					miR-142-3p	
					miR-451	
					miR-22*	
					miR-526b*	
					miR-520a-3p	
					miR-10b	

					miR-20a	
					miR-518f*	
					miR-146b-5p	
					miR-517c	
					miR-518c	
					miR-525-5p	
					miR-519e*	
					miR-126*	
Lázár et al 2012	(221)	Case control	Placenta	miR-325	NA	miR-325
					miR-20b	
				miR-20b	miR-516a-5p	
				miR-151-3p	miR-512-3p	miR-151-3p
				miR-524-3p	miR-2277	miR-146a
Wang et al 2012	(80)	Case control	Placenta	miR-34c-5p	miR-524-3p	miR-192
				miR-20a	miR-17	miR-34c-5p
				miR-17	miR-20a	
				miR-1975	miR-20b	
				miR-574-5p	miR-574-5p	
				miR-26a	miR-26a	
				miR-151-3p	miR-151-3p	
Wu et al 2012	(52)	Case control	Blood	miR-130a	miR-130a	miR-144
				miR-181a	miR-181a	miR-16
				miR-130b	miR-130b	
				miR-30d	miR-30d	
				miR-145	miR-145	

				miR-103	miR-103	
				miR-425	miR-425	
				miR-221	miR-221	
				miR-342-3p	miR-342-3p	
				miR-24	miR-24	
				miR-144	miR-24	
				miR-16	miR-26a	
					miR-103	
					miR-130b	
					miR-181a	
					miR-342-3p	
					miR-574-5p	
Zhang et al 2012	(27)	Case control	Blood	miR-210	miR-210	NA
Anton et al 2013	(198)	A case-control study and a prospective cohort study	Blood	miR-210	miR-210	NA
Betoni et al 2013	(25)	Case control	Placenta	847 miRNAs miR-210 miR-182* miR-30a-3p	miR-210_st miR-193b_st miR-210 miR-182*	NA

					miR-92b	
					miR-197	
					miR-342-3p	
					miR-296-5p	
					miR-26b	
					miR-25	
				158 miRNAs	miR-296-3p	
				miR-92b	miR-26a	
				miR-197	miR-198	
Choi et al				miR-342-3p		miR-21
2013	(214)	Case control	Placenta	miR-296-4p	miR-202	miR-223
				miR-26b	miR-191	
				miR-25	miR-95	
				miR-296-3p	miR-204	
					miR-92b	
					miR-197	
					miR-342-3p	
					miR-296-4p	
					miR-26b	
					miR-25	
					miR-296-3p	
				miR-520A-		
				5p		
Guo et al				miR-194	NA	miR-194
2013	(70)	Case control	Placenta	miR-412		miR-149
				miR-149		

				miR-483		
				miR-503		
				miR-516-5p		
				miR-517*	miR-516-5	
Hromadni				miR-518b	miR-517*	
kova et al	(206)	Cohort	Blood	miR-520a*	miR-520a*	NA
2013				miR-520h	miR-525	
				miR-525	miR-526a	
				miR-526a		
Kumar et	(199)	Case control	Placenta	miR-106a	miR-106a	NA
al 2013				miR-19b	miR-19b	
				miR-141	miR-141	
Li et al	(69)	Case control	Blood	miR-144	miR-29a	
2013				miR-221	miR-141	miR-144
				miR-29a	miR-221	
					miR-29a	
Campos	(211)	Case control	Blood	miR-125b	NA	miR-196b
et al 2014				miR-146a		
				miR-196b		
Doridot et	(230)	Case control	Placenta	pri-miR-34a	pri-miR-34a	NA
al 2014						
Hong et	(147)	Case control	Placenta	miR-126	NA	miR-126
al 2014						

Lalève et al 2014	(34)	Prospective case-control	Placenta	miR-526B miR-518B miR-517A miR-210 miR-455-3P miR-455-5P	miR-210	miR-455-3P miR-455-5P
Li et al 2014	(148)	Case control	Placenta	miR-125b-1- 3p	miR-125b-1- 3p	NA
Li et al 2014	(42)	Case control	Placenta	miR-155	miR-155	NA
Luo et al 2014	(35)	Case control	Placenta	miR-210	miR-210	NA
Luque et al 2014	(59)	Nested case- control	Blood	754 miRNAs miR-192 miR-143 miR-125b miR-127 miR-942 miR-126# miR-221	miR-192 miR-143 miR-125b	miR-127 miR-942 miR-126# miR-221

Ura et al 2014	(23)	Retrospective study	Blood	754 miRNAs	miR-1233	miR-126
					miR-650	miR-335
					miR-520a	miR-144
					miR-215	miR-204
					miR-210	miR-668
					miR-25	miR-376a
					miR-518b	miR-15b
					miR-193a-3p	miR-204
					miR-32	miR-296-5p
					miR-152	
Weedon- Fekjær et al 2014	(22)	Case control	Placenta	~900 miRNAs	12 miRNAs	
				miR-223-3p	miR-223-3p	
				miR-224-5p	miR-224-5p	
				miR-1301	miR-1301	
Xu et al 2014	(24)	Prospective cohort	Blood + Placenta	211 miRNAs	miR-181a	miR-214
					miR-584	miR-218
					miR-17	miR-590
					miR-18a	miR-18a
					miR-19b1	miR-19a
					miR-92a1	miR-379
					miR-210	miR-411
					miR-193b	miR-195
miR-638	miR-223					

					miR-525*	miR-363
					miR-515-3p	miR-542-3p
					miR-519e*	miR-195
					miR-518b	miR-223
					miR-524	miR-218
					miR-296	miR-18a
					miR-362	miR-379
					miR-210	miR-411
					miR-30a-3p	miR-18a
					miR-518b	miR-19b1
					miR-524	miR-92a1
					miR-17-3p	
					miR-151	
					miR-193b	
					miR-210	
Zou et al 2014	(187)	Case control	Placenta	miR-101	NA	miR-101
Akehrst et al 2015	(207)	Cohort	Blood + Placenta	754 miRNAs	miR-196b-5p miR-206-5p miR-502-5p miR-503-5p miR-758-3p	miR-23a*
Anton et al 2015	(197)	Case control	Placenta	miR-517a/b miR-517c	miR-517a/b miR-517c	NA

Ding et al 2015	(146)	Case control	Placenta	miR-519d-3p	miR-519d-3p	NA
				32		
				microRNAs		
				miR-1-3p		
				miR-16-5p		
				miR-17-5p		
				miR-20a-5p		
				miR-20b-5p		
				miR-21-5p		
				miR-23a-3p		
				miR-24-3p		
				miR-26a-5p		
Hromadni kova et al 2015	(204)	Retrospective cohort	Placenta	miR-29a-3p	miR-499a-5p	NA
				miR-33a-5p		
				miR-92a-3p		
				miR-100-5p		
				miR-103a-3p		
				miR-122-5p		
				miR-125b-5p		
				miR-126-3p,		
				miR-130b-3p		
				miR-133a-3p		
				miR-143-3p		

				miR-145-5p		
				miR-146a-5p		
				miR-155-5p		
				miR-181a-5p		
				miR-195-5p		
				miR-199a-5p		
				miR-208a-3p		
				miR-210-3p		
				miR-221-3p		
				miR-342-3p		
				miR-499a-5p		
				miR-574-3p		
				miR-512-5p		miR-515-5p
				miR-515-5p		miR-517-5p
				miR-516-5p		miR-518b
				miR-517-5p		miR-518f-5p
Hromadni kova et al 2015	(205)	Retrospective cohort	Placenta	miR-518b	NA	miR-519a miR-519d miR-520a- 5p miR-520h miR-524-5p
				miR-518f-5p		
				miR-519a		
				miR-519d		
				miR-519e-5p		

				miR-520a-5p		miR-525 miR-526a
				miR-520h		
				miR-524-5p		
				miR-525		
				miR-526a		
				miR-526b		
Jiang et al 2015	(168)	Case control	Placenta	miR-335 miR-584	miR-335 miR-584	NA
Lasabová et al 2015	(41)	Cohort	Placenta	miR-155 miR-122 miR-21	miR-155 miR-122 miR-21	NA
Li et al 2015	(20)	Cohort	Blood	10 microRNAs	miR-152 miR-183 miR-210 miR-182	NA
Miura et al 2015	(50)	Case control	Blood	miR-518b miR-1323 miR-516b miR-516a-5p miR-525-5p miR-515-5p miR-520 h miR-520a-5p	miR-518b miR-1323 miR-516b miR-516a-5p miR-525-5p miR-515-5p miR-520 h miR-520a-5p	NA

				miR-519d	miR-519d	
				miR-526b	miR-526b	
				let-7f-5p		
				miR-98-5p		
				miR-221-3p		
				miR-222-3p		
				miR-126-3p		
				miR-130a-3p		
				miR-210-3p		
				miR-155-5p	miR-98-5p	
					miR-222-3p	
				miR-17-5p	miR-210-3p	
Murphy et al 2015	(219)	Prospective longitudinal cohort	Blood	miR-18a-5p	miR-155-5p	miR-16-5p
				miR-19a-3p	miR-296-3p	
				miR-29a-3p	miR-181a-5p	
					miR-29b-3p	
				miR-92a-3p		
				miR-20a-5p		
				miR-20b-5p		
				miR-15b-5p		
				miR-16-5p		
				miR-296-3p		
				miR-181a-5p		
				miR-195-5p		

miR-29b-3p						
Sun et al 2015	(145)	Case control	Placenta	miR-34a	miR-34a	NA
Zhang et al 2015	(21)	Case control	Placenta	miR-106a miR-106a miR-18b miR-20b miR-19b-2 miR-92a-2 miR-363	miR-1 miR-16 miR-19b miR-20a miR-125b-1-3p miR-181a miR-182 miR-210 miR-355 miR-424 miR-1469 miR-106a	miR-29a-3p miR-200c miR-335 miR-363 miR-584 miR-744 miR-1826 miR-18b miR-19b miR-92a miR-363
Brooks et al 2016	(201)	Case control	Placenta	Supplemental Table 2	Supplemental Table 2	Supplemental Table 2
Hromadnikova et al 2016	(203)	Retrospective cohort	Blood	miR-1-3p miR-16-5p miR-17-5p	NA	miR-100-5p miR-125b-5p

miR-20a-5p
miR-20b-5p
miR-21-5p
miR-23a-3p
miR-24-3p
miR-26a-5p
miR-29a-3p
miR-92a-3p
miR-100-5p
miR-103a-3p
miR-122-5p
miR-125b-5p
miR-126-3p
miR-130b-
3p
miR-133a-3p
miR-143-3p
miR-145-5p
miR-146a-5p
miR-181a-5p

				miR-195-5p		
				miR-199a-5p		
				miR-210-3p		
				miR-221-3p		
				miR-342-3p		
				miR-499a-5p		
				miR-574-3p		
Hu et al 2016	(81)	Case control	Placenta	miR-200c miR-20a miR-20b	miR-200c miR-20a miR-20b	NA
Munaut et al 2016	(Munaut et al., 2016)	Prospective cohort	Blood	hsa-miR- 144-3p hsa-miR- 29a-3p hsa-miR- 210-3p hsa-miR- 210-5p hsa-miR- 1233-3p hsa-miR- 1233-5p hsa-miR-24- 3p hsa-miR-	miR-210-3p miR-210-5p miR-1233-3p miR-574-5p	NA

				26a-5p		
				hsa-miR-		
				130b-3p		
				hsa-miR-		
				130b-5p		
				hsa-miR-		
				181a-5p		
				hsa-miR-		
				181a-3p		
				hsa-miR-		
				342-3p		
				hsa-miR-		
				574-5p		
				hsa-miR-16-		
				2-3p		
				hsa-miR-		
				124-3p		
				hsa-miR-		
				155-5p		
Ospina-						
Prieto et	(209)	Case control	Placenta	miR-141	miR-141	NA
al 2016						
Sandrim				84 miRs	miR-885-5p	miR-376c-3p
et al 2016	(210)	Case control	Blood	miR-885-5p	miR-885-5p	miR-19a-3p
				miR-376	miR-885-5p	miR-19b-3p

							miR-518b
							miR-519e-5p
							miR-515-5p
							miR-518f
							miR-519c-3p
							787 miRNAs
							miR-148a-3p
							miR-210
							miR-193b-3p
							miR-148a-3p
							miR-210
							miR-193b-3p
							miR-31-5p
							miR-135b-5p
Zhou et al 2016	(19)	Case control	Placenta	miR-365a-3p	miR-31-5p		miR-136-3p
				miR-516b-5p	miR-365a-3p		
					miR-516b-5p		
				miR-520a-5p	miR-520a-5p		
				miR-27a-5p	miR-27a-5p		
				miR-135b-5p			
				miR-136-3p			
				miR-10b-5p			
				miR-192-5p			
Adel et al 2017	(18)	Case control	Placenta	miR-210	miR-210		NA

Azizi et al 2017	(217)	Case control	Placenta	miR-155-5p	miR-155-5p	NA
Fang et al 2017	(143)	Case control	Placenta	miRNA-218	miR-218	NA
Gan et al 2017	(17)	Case control	Blood	miR-210 miR-155 miR-125b-5p miR-125a-5p	miR-210 miR-155	miR-125a- 5p
Gunel et al 2017	(100)	Case control	Blood + Placenta	12 miRNAs	let-7b* let-7f-1* miR-1183 miR-23c miR-425*	NA
Guo et al 2017	(142)	Case control	Placenta	miR-34a	miR-34a	NA
Hromadni kova et al 2017	(48)	Nested case control study of a longitudinal cohort	Blood	miR-516b-5p miR-517-5p miR-518b miR-520a-5p miR-520h miR-525-5p	miR-517-5p miR-518b miR-520h	NA

Jairajpuri et al 2017	(2)	Case control	Blood	84 miRNAs	miR-215 miR-155 miR-650 miR-210 miR-21	miR-18a miR-19b1
Jiang et al 2017	(166)	Cohort	Blood	miR-520g	miR-520g	NA
Jin et al 2017	(79)	Case control	Blood + Placenta	miR-20b	miR-20b	NA
Korkes et al 2017	(33)	Case control	Placenta	miR-210	miR-210	NA
Lu et al 2017	(92)	Case control	Placenta	miR-137	miR-137	NA
Luo et al 2017	(114)	Case control	Placenta	miR-148a	NA	miR-148a
Nizyaeva et al 2017	(40)	Case control	Placenta	miR-146a miR-155	miR-155	miR-146a miR-155
Shao et al 2017	(91)	Case control	Placenta	miR-22	miR-22	NA
Singh et al 2017	(196)	Cohort/case control	Placenta	miR-202-3p	miR-202-3p has-miR- 202-3p_st ENSG00000	hp_hsa-mir- 320b-1_x_st has-miR- 432-star_st

					221611_st	hsa-miR-4701-3p_st
					hsa-miR-25-star_st	hp_hsa-miR-933_st
					hsa-miR-451_st	
					has-miR548aj_st	
Tsai et al 2017	(228)	Case control	Blood + Placenta	miR-346 miR-582-3p	miR-346 miR-582-3p	miR-346
Wang et al 2017	(72)	Case control	Placenta	miR-18b	NA	miR-18b
Xiao et al 2017	(68)	Case control	Placenta	miR-144	NA	miR-144
Xu et al 2017	(167)	Case control	Placenta	let-7i	NA	let-7i
Yang et al 2017	(43)	Case control	Blood + Placenta	miR-155	miR-155	NA
Zhang et al 2017	(99)	Nested case-control study	Blood	miR-942	NA	miR-942
Brkić et al 2018	(220)	Case control	Placenta	miR-218-5p	NA	miR-218-5p
Chen et al 2018	(36)	Case control	Placenta	miR-210	miR-210	NA

Chi; Zhang 2018	(161)	Case control	Placenta	miR-145	NA	miR-145
Fang et al 2018	(135)	Case control	Placenta	miR-182-5p	miR-182-5p	NA
Fu et al 2018	(134)	Case control	Placenta	miRNA-517- 5p	miR-517-5p	NA
Gao et al 2018	(165)	Case control	Placenta	miR-299	miR-299	NA
Gunel et al 2018	(74)	Case control	Blood + Placenta	miR-195	NA	miR-195
Khaliq et al 2018	(51)	Case control	Blood + Placenta	miR-222 miR-29a miR-181a	miR-29a miR-181a	miR-222
Li et al 2018	(138)	Case control	Blood + Placenta	miRNA-376c	NA	miR-376c
Liu et al 2018	(140)	Case control	Placenta	miR-203	miR-203	NA

					PE	
					miR-124*	
					miR-130b	
					miR-155	
					miR-383	
					miR-423-3p	
					miR-431	miR-126*
					miR-500a	miR-544
Lykoudi et al 2018	(3)	Case control	Placenta	miR-518a-5p	miR-1183	miR-3942
					miR-1305	miR-544
					miR-124*	miR-3942
					miR-130b	
					miR-383	
					miR-423-3p	
					miR-431	
					miR-518a-5p	
					miR-383	
					miR-1183	
Martinez- Fierro et al 2018	(224)	Nested cohort case-control	Blood	51 members of chromosome 19 miRNA cluster	miR-520c-3p miR-518f miR-512-3p miR-520d-3p	NA

Niu et al 2018	(141)	Case control	Placenta	miR-30a-3p	miR-30a-3p	NA
Nizyaeva et al 2018	(54)	Case control	Placenta	miR-17 miR-181a miR-519a	miR-519a miR-181a	miR-181a
Sandrim et al 2018	(212)	Case control	Blood	Let-7a-5p	NA	Let-7a-5p
Timofeev a et al 2018	(102)	Cohort 1	Blood + Placenta	hsa-miR- 532-5p hsa-miR- 423-5p hsa-miR- 127-3p hsa-miR- 539-5p hsa-let-7c- 5p hsa-miR- 629-5p hsa-miR- 519a-3p	miR-423-5p miR-127-3p miR-539-5p miR-629-5p miR-423-5p miR-629-5p miR-519a-3p let-7c-5p miR-519a-3p miR-519a-3p miR-519a- 3p	miR-532-5p miR-423-5p miR-127-3p miR-539-5p miR-629-5p miR-519a- 3p let-7c-5p miR-532-5p miR-127-3p miR-539-5p miR-629-5p miR-519a- 3p let-7c-5p

				miR-181a-5p miR-181a-3p miR-181c let-7 miR-625 miR-454 miR-34c miR-483-3p miR-663b	miR-892c-3p miR-378c miR-514b-3p miR-663	NA
Wang et al 2018	(90)	Case control	Placenta			
Wang et al 2018	(76)	Cohort/case control	Blood	miR-195	NA	miR-195 miR-195
Wang; Yan 2018	(139)	Case control	Placenta	miR-454	NA	miR-454
Wu et al 2018	(164)	Case control	Placenta	miR-181a-5p	miR-181a-5p	NA
Awamleh et al 2019	(15)	Cohort	Placenta	hsa-miR-193b-5p hsa-miR-193b-3p hsa-miR-210-3p hsa-miR-365a-3p hsa-miR-	miR-210-5p miR-181a-2-3p miR-33b-3p	NA

				365b-3p		
				hsa-miR-520a-3p		
				hsa-miR-210-5p		
				hsa-miR-181a-2-3p		
				hsa-miR-33b-3p		
Biró et al 2019	(32)	Case control	Placenta	miR-210 miR-517 miR-16	miR-210 miR-517	NA
Cao et al 2019	(158)	Case control	Blood + Placenta	miR-200a-3p miR-141-3p	miR-200a-3p miR-141-3p	NA
Demirer et al 2019	(46)	Case control	Blood	miR-518b	miR-518b	NA
Dong et al 2019	(98)	Case control	Blood	miR-31 miR-21 miR-16	NA	miR-31 miR-21
Hocaoglu et al 2019	(202)	Case control	Blood	miR-21-3p miR-155-5p miR-16-5p	NA	miR-21-3p miR-155-5p

Huang et al 2019	(136)	Case control	Placenta	miR-181a-5p	miR-181a-5p	NA
Liu et al 2019	(133)	Case-control	Placenta	miR-142-3p	miR-142-3p	NA
Lv et al 2019	(130)	Case control	Placenta	miR-145-5p	NA	miR-145-5p
Ma et al 2019	(106)	Prospective cohort study	Blood	miR-133a miR-206	NA	miR-133a miR-206
Martinez-Fierro 2019	(223)	Retrospective nested cohort case-control	Blood	hsa-miR-628-3p hsa-miR-628-5p	miR-628-3p miR-628-5p	NA
Nejad et al 2019	(216)	Case control	Blood	miR-210-3p miR-517c-3p	miR-210-3p miR-517c-3p	NA
Qian; Liu 2019	(157)	Case control	Placenta	miR-30b	miR-30b	NA
Sekar et al 2019	(225)	Case control	Blood	miR-510	miR-510	NA
Shi et al 2019	(16)	Case-control	Placenta	miR-652-3p miR-210	miR-210	miR-652-3p

Shi et al 2019	(162)	Case control	Placenta	miR-454	NA	miR-454
Tang et al 2019	(195)	Case control	Placenta	miR-424	NA	miR-424
Wang et al 2019	(13)	Case control	Placenta	miR-210	miR-210	NA
Wang et al 2019	(15)	Case control	Placenta	miR-210	miR-210	NA
Wang et al 2019	(229)	Case-control	Blood	miR-141 miR-200a miR-200b miR-429	miR-141 miR-200a	NA
Wang et al 2019	(137)	Case control	Placenta	miR-19a-3p	NA	miR-19a-3p
Wang et al 2019	(188)	Case control	Placenta	miR-141-5p	NA	miR-141-5p
Xie et al 2019	(131)	Case control	Placenta	miR-320a	NA	miR-320a
Xue et al 2019	(160)	Case control	Placenta	miR-34a-5p	miR-34a-5p	NA

Yang et al 2019	(132)	Case-control	Blood + Placenta	miR-376c miR-377 miR-411	miR-376c miR-441	NA
Yang et al 2019	(189)	Case control	Placenta	miR-221-3p	NA	miR-221-3p
Yang et al 2019	(190)	Case control	Placenta	miR-26a-5p	miR-26a-5p	NA
Yang; Guo 2019	(159)	Case control	Placenta	miR-342-3p	miR-342-3p	NA
Yang; Meng 2019	(163)	Case control	Placenta	miR-431	miR-431	NA
Youssef; Marei 2019	(14)	Case control	Blood	microRNA-210 microRNA-155	miR-210 miR-155	NA
Zhong et al 2019	(104)	Cohort/case control	Blood	Table 2	miR-1304-5p miR-320a miR-5002-5p	26 miRNAs miR-188-3p miR-211-5p hiv1-miR-TAR-3p miR-4432 miR-4498

Demirer et al 2020	(49)	Prospective cohort	Blood	miR-518b miR-155-5p miR-21-3p	miR-518b	NA
Dong et al 2020	(121)	Case control	Placenta	miR-222-5p	NA	miR-222-5p
Fan et al 2020	(126)	Case control	Placenta	miR-23a	miR-23a	NA
Gai et al 2020	(119)	Case control	Placenta	miR-182-5p	miR-182-5p	NA
Ghafari et al 2020	(10)	Case control	Blood	miR-155 miR-210 miR-494 miR-29b miR-34a	miR-155 miR-210 miR-494	miR-29b
Gusar et al 2020	(82)	Case control	Blood + Placenta	miR-27b-3p miR-92b-3p miR-181a-5p miR-186-5p	miR-27b-3p miR-92b-3p miR-181a-5p miR-186-5p	miR-27b-3p miR-186-5p
Huang et al 2020	(191)	Case control	Placenta	miR-139-5p	NA	miR-139-5p
Jelena et al 2020	(47)	Case control	Blood	miR-210-3p miR-518b	miR-518b	NA

Kim et al 2020	(45)	Case control	Blood	miR-31 miR-155	miR-31 miR-155	NA
Kim et al 2020	(45)	Case control	Blood	miR-31-5p	miR-31-5p	NA
Kim et al 2020	(215)	Case control	Blood	miR-31-5p miR-155-5p miR-214-3p miR-1290-3p	miR-31-5p miR-155-5p miR-214-3p	miR-1290-3p
Leseva et al 2020	(208)	Cohort/case control	Placenta	miR-138	miR-138	NA
Li et al 2020	(57)	Case-control	Blood + Placenta	16 miRNAs	let-7a-5p miR-15a-5p miR-92a-1-3p miR-106a miR-125b miR-130a-3p miR-191-5p miR-374a-5p miR-574-5p	miR-22-5p miR-93-5p miR-126-3p miR-204-3p miR-365a-3p miR-559-5p miR-4264-5p
Li et al 2020	(66)	Case control	Placenta	miR-383 miR-16	miR-16	miR-383

Li et al 2020	(192)	Case control	Placenta	miR-507	miR-507	NA
Lip et al 2020	(97)	Case control	Blood	miR-574-5p miR-1972 miR-4793-3p	miR-574-5p miR-1972 miR-4793-3p	NA
Liu et al 2020	(122)	Case control	Placenta	miR-491-5p	miR-491-5p	NA
Liu et al 2020	(156)	Case control	Placenta	miR-149-5p	NA	miR-149-5p
Mavreli et al 2020	(103)	Mix: case control/cohort	Blood	miR-23b-5p miR-99b-5p	NA	miR-23b-5p miR-99b-5p
Mi et al 2020	(154)	Case control	Placenta	miR-196a-5p	NA	miR-196a- 5p
Sheng et al 2020	(128)	Case control	Blood	miR-206	miR-206	NA
Suo et al 2020	(63)	Case control	Placenta	miR-183	miR-183	NA
Tao et al 2020	(124)	Case control	Placenta	miR-124-3p	miR-124-3p	NA

						miR-363
						miR-149
						miR-18a
				41 miRs		miR-1283
				miR363		miR-16
				miR149		miR-424
Whigham et al 2020	(67)	Mix: case control/cohort	Blood + Placenta	miR149 miR18a miR1283 miR16 miR424	NA	miR-363 miR-18a miR-363 miR-149 miR-16
						miR-363
						miR-149
Wu et al 2020	(193)	Case control	Placenta	miR-135a-5p	NA	miR-135a- 5p
Xu et al 2020	(111)	Case control	Placenta	miR-134-5p	NA	miR-134-5p
Yang; Meng 2020	(129)	Case control	Placenta	miR-215-5p	miR-215-5p	NA
Zhang et al 2020	(88)	Case control	Placenta	hsa-miR-937 hsa-miR- 148b*	miR-367*	miR-937 miR-148b* miR-3907

				hsa-miR-3907		
				hsa-miR-367*		
Zhang et al 2020	(155)	Case control	Placenta	miR-346	miR-346	NA
Zheng et al 2020	(127)	Case control	Blood + Placenta	miR-27a	miR-27a	NA
Abbas et al 2021	(86)	Case control	Placenta	miRNA-452	miR-452	NA
Akgör et al 2021	(12)	Case control	Blood	miR-142-3p miR-218-5p miR-125b-5p miR-152 miR-17-5p miR-128 miR-302b-3p miR-24-3p miR-191-5p miR-328 miR-29a-3p miR-132-3p miR-197-3p miR-342-3p	miR-210 miR-375 miR-197-3p miR-132-3p miR-29a-3p miR-328 miR-24-3p miR-218-5p	miR-302b-3p miR-191-5p miR-17-5p

Fan et al 2021	(149)	Case control	Placenta	miR-762	NA	miR-762
Gao et al 2021	(115)	Cohort	Blood + Placenta	miR-300	miR-300	NA
Han et al 2021	(125)	Case control	Blood + Placenta	miR-483	NA	miR-483
Hu et al 2021	(117)	Case control	Placenta	miR-149-5p	NA	miR-149-5p
Jairajpuri et al 2021	(11)	Case control	Blood	miRNA-210	miR-210	NA
Jin et al 2021	(31)	Case control	Blood	miR-19a miR-126 miRNA-210	miR-19a miR-210	miR-126
Jin et al 2021	(174)	Case control	Blood + Placenta	miR-3935	NA	miR-3935
Kolkova et al 2021	(227)	Case control	Blood	miR-21-5p miR-155-5p miR-210-5p miR-16-5p miR-650	miR-21-5p miR-155-5p	NA

Lai; Yu 2021	(62)	Case control	Placenta	miR-183	miR-183	NA
Lei et al 2021	(94)	Case control	Placenta	miR-520a-3p	NA	miR-520a-3p
Liao et al 2021	(96)	Case control	Blood	miR-320a	miR-320a	NA
Licini et al 2021	(56)	Case-control study nested in a cohort study	Blood + Placenta	miR-125b	miR-125b	NA
Liu et al 2021	(87)	Case control	Placenta	microRNA- 126	miR-126	NA
Liu et al 2021	(182)	Case control	Placenta	miR-558	NA	miR-558
Luizon et al 2021	(105)	A case-control study based in a prospective cohort	Blood	84 circulating miRNAs	miR-204-5p	NA
Luo et al	(170)	Case control	Placenta	miR23a-5p	miR23a-5p	NA
Mao; Zou 2021	(173)	Case control	Placenta	miR-326	miR-326	NA

Martinez-Fierro ML; Garza-Veloz I 2021	(85)	Retrospective nested cohort case-control	Blood	768 miRNAs	Supplementary table	miR-133a-3p miR-197-3p
Ni et al 2021	(153)	Case control	Placenta	miR-95-5p	miR-95-5p	NA
Sharma et al 2021	(226)	Case control	Blood + Placenta	miR-146-5p miR-187-5p	miR-146-5p miR-187-5p	miR-146-5p miR-187-5p
Song et al 2021	(123)	Case control	Placenta	miR-655-3p	miR-655-3p	NA
Tang et al 2021	(55)	Case control	Blood	miR-125b	miR-125b	NA
Trongpitsuak; Phupong 2021	(77)	Prospective observational study (cohort)	Blood	miR-210	NA	miR-210
Wang et al 2021	(39)	Case control and cohort	Blood + Placenta	miR-155	miR-155	NA
Witvrouw en et al 2021	(71)	Prospective case-control	Blood	miR-16 miR-29b miR-126	miR-200c	miR-16

				miR-155		
				miR-200c		
Wu et al 2021	(172)	Case control	Placenta	miR-302a	miR-302a	NA
Yang 2021	(93)	Case control	Placenta	miR-133b	miR-133b	NA
Yang et al 2021	(73)	Case control	Placenta	miR-18b	NA	miR-18b
Yin et al 2021	(118)	Case control	Placenta	miR-138-5p	NA	miR-138-5p
Yu et al 2021	(151)	Case control	Placenta	miR-146a	miR-146a	NA
Yu et al 2021	(194)	Case control	Placenta	miR-218-5p	miR-218-5p	NA
Zhang et al 2021	(120)	Case control	Placenta	miR-525-5p	NA	miR-525-5p
Zhao et al 2021	(116)	Case control	Placenta	miR-135	NA	miR-135
Zhao et al 2021	(64)	Case control	Placenta	miR-16	miR-16	NA

				miR-129-2-3p, miR-409-3p, miR-765, miR-371a-5p, miR-296-5p, miR-874-3p, miR-605, miR-371a-5p		
Zhou et al 2021	(101)	Case control	Placenta	miR-513a-5p, miR-513c-5p, miR-126-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-193b-5p, miR-27a-5p, miR-412-5p, and miR-497-5p	miR-513c-5p, miR-126-3p, miR-145-5p, miR-193b-5p, miR-296-5p	NA
Zhu; Liu 2021	(84)	Case control	Blood	miR-27b-3p	miR-27b-3p	NA
Zhu; Wang 2021	(61)	Case control	Placenta	miR-183	miR-183	NA
Dong et al 2022	(175)	Cohort	Blood	miR-345-3p	NA	miR-345-3p

Du et al 2022	(169)	Case control	Blood	miR-193b-5p	miR-193b-5p	NA
Jiang et al 2022	(95)	Case control	Placenta	miR-140-5p	NA	miR-140-5p
Li et al 2022	(176)	Case control	Placenta	miR-558	NA	miR-558
Li et al 2022	(177)	Case control	Blood + Placenta	miR-24-3p	miR-24-3p	NA
Li; Li 2022	(185)	Case control	Placenta	miR-424-5p	NA	miR-424-5p
Liu et al 2022	(181)	Case control	Placenta	miR-942-5p	NA	miR-942-5p
Simsek et al 2022	(60)	Case control	Blood + Placenta	miR-1 miR-125b	miR-125b	miR-1 miR-125b
Wang et al 2022	(178)	Case control	Placenta	miR-330-5p	miR-330-5p	NA
Wang et al 2022	(184)	Case control	Placenta	miR-346	miR-346	NA
Wei et al 2022	(186)	Case control	Placenta	miR-128-3p	miR-128-3p	NA

Xing et al 2022	(180)	Case control	Placenta	miR-558	NA	miR-558
Yang et al 2022	(83)	Case control	Blood	miR-27b-3p	miR-27b-3p	NA
Yuan et al 2022	(183)	Cohort	Placenta	miR-532-3p miR-423-5p	NA	miR-532-3p miR-423-5p
Zhang; Wang 2022	(179)	Case control	Placenta	miR-202-5p	miR-202-5p	NA

OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS

Adicionalmente aos estudos já apresentados, a aluna colaborou com estudos da linha de pesquisa sobre doença renal, o que resultou na publicação de dois artigos, conforme exposto a seguir.

ARTIGO 1 - Hemostasis and oxidative stress in chronic kidney disease in children and adolescents

LOPES, Ana Cristina dos Santos; SOUSA, Letícia Parreiras Nunes; SILVA, Rívia Mara Moraes; SILVA, Ana Cristina Simões; DUSSE, Luci Maria SantAna; ALPOIM, Patrícia Nessleralla. Hemostasis and oxidative stress in chronic kidney disease in children and adolescents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2022 Sep 1;100(9):926-936. doi: 10.1139/cjpp-2021-0714. Epub 2022 May 25. PMID: 35613472.

Artigo publicado na revista *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (Qualis B1) em 2022.

Hemostasis and oxidative stress in chronic kidney disease in children and adolescents

Ana Cristina dos Santos Lopes[✉], Leticia Parreiras Nunes Sousa^a, Rívia Mara Moraes e Silva^a, Ana Cristina Simões e Silva^b, Luci Maria SantAna Dusse^b, and Patrícia Nessler Alpoim^a

^aDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas—Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil; ^bUnidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

Corresponding author: **Patrícia Nessler Alpoim** (email: patnessralla@yahoo.com.br)

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) can be defined as the progressive loss of renal function, characterized by a decreased glomerular filtration rate (GFR). The etiology of CKD in childhood is mainly associated with congenital anomalies of the kidneys and urinary tract (CAKUT) and with glomerular diseases. The goal of this study was to investigate the hemostasis and oxidative stress in pediatric CKD of different etiologies. Fifty-four CKD children and adolescents and 52 controls were enrolled in this study. The evaluation of hemostasis was carried out by determination of D-dimer (D-Di) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) plasma levels, while oxidative stress was evaluated by thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels, protein carbonyl content, plasma antioxidant capacity (MTT), and ascorbate. The D-Di was increased in CAKUT stage 3 or 4 patients compared with those with glomerular disease. PAI-1 was increased in patients with glomerular disease compared with CAKUT. Carbonyl protein content was higher in the control group compared with glomerular disease stage 3 or 4 patients. Our findings showed that the reduction in GFR is associated with a state of hypercoagulability. The analysis of integrated networks showed an expansion of connections among hemostatic and oxidative stress markers in CKD children and adolescents compared with controls.

Key words: chronic kidney disease, hemostasis, oxidative stress, children, adolescents

Résumé

L'insuffisance rénale chronique (IRC) correspond à une détérioration progressive du fonctionnement des reins caractérisée par une diminution du taux de filtration glomérulaire (TFG). L'étiologie de l'IRC chez l'enfant est principalement associée aux anomalies congénitales des reins et de l'arbre urinaire (ACRAU), ainsi qu'à des maladies glomérulaires. Cette étude portait sur l'hémostase et le stress oxydatif dans l'IRC pédiatrique d'étiologies diverses. Nous avons inscrit à cette étude 54 enfants et adolescents atteints d'IRC, avec 52 sujets témoins. Nous avons procédé à l'évaluation de l'hémostase en établissant les taux plasmatiques de d-dimères (D-Di) et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), et celle du stress oxydatif avec les taux de dérivés réactifs de l'acide thiobarbiturique (TBARS), le taux de protéine carbonyl, la capacité antioxydante plasmatique (MTT) et l'acide ascorbique. Nous avons observé une hausse plus marquée des D-Di chez les patients présentant une ACRAU au stade 3 ou 4 qu'en cas de maladie glomérulaire. La hausse du PAI-1 était plus importante avec la maladie glomérulaire que chez les patients atteints d'ACRAU. Le taux de protéine carbonyl était plus élevé chez les témoins que chez les patients atteints d'une maladie glomérulaire au stade 3 ou 4. Nos résultats ont montré que la diminution du TFG est associée à un état d'hypercoagulabilité. L'étude de réseaux intégrés a montré une expansion des connexions parmi les marqueurs de l'hémostase et du stress oxydatif plus importante chez les enfants et les adolescents atteints d'IRC que chez les témoins. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : insuffisance rénale chronique; hémostase, stress oxydatif; enfants; adolescents.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) can be defined as the progressive loss of renal function, characterized by a glomerular filtration rate (GFR) of less than 90 mL/min/1.73 m² for more than three months, regardless of the associated etiology

(Becherucci et al. 2016; Belangero et al. 2018). Although the pathophysiological mechanisms of CKD in adults and children are basically the same, children are affected in particular ways, especially with regard to their development. In childhood, CKD varies in terms of etiology and adjacent car-

diovascular complications, generating impacts not only for the child at present but also on the health of the adult that they will become (Becherucci et al. 2016).

The etiology of CKD in childhood is mainly associated with conditions such as congenital anomalies of the kidneys and urinary tract (CAKUT) and also with other glomerular diseases, like focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) (Becherucci et al. 2016; Monteverde et al. 2020). CAKUT corresponds to a group of congenital abnormalities that affect the kidneys and urinary tract and may account for about half of CKD cases (Dart et al. 2015; Nicolaou et al. 2015). However, FSGS is a progressive pathological condition characterized by histopathological lesion in the glomeruli of often unknown etiology (D'Agati et al. 2011). According to the National Kidney Foundation, CKD can be classified into five stages based on the GFR: stage 1 (≥ 90 mL/min/1.73 m²); stage 2 (60–89 mL/min/1.73 m²); stage 3 (30–59 mL/min/1.73 m²); stage 4 (15–29 mL/min/1.73 m²); and stage 5 (<15 or dialysis mL/min/1.73 m²) (National Kidney Foundation 2002).

The final step of the hemostatic process is the breakdown of the fibrin clot by plasmin into fibrin degradation products (FDPs), whose smallest fragment is the D-dimer (D-Di). Plasminogen is converted to plasmin by tissue plasminogen activator (t-PA) and urokinase (u-PA) action. PAI-1 inhibits t-PA, thereby inhibiting fibrinolysis and prolonging the clot's maintenance in the blood vessel. Elevated D-Di plasma levels are associated with higher fibrin clot formation or its lysis (Gaffney et al. 1988). Laboratorial assessment of D-Di and PAI-1 plasma levels is useful to estimate the fibrin formation and degradation (Ott et al. 1988).

Oxidative stress is characterized by an imbalance between oxidizing and antioxidant agents in the body, in which oxidizing agents are found in excess, either by increased production or by decreased removal (Pizzino et al. 2017). However, the detection of reactive species is complex, as active intermediates are produced in minimal amounts, are extremely reactive and have a very short half-life (Himmelfarb et al. 2002). An alternative is the indirect detection of these radicals by quantifying the products resulting from the oxidative action on endogenous compounds such as lipids, proteins and nucleic acids (Templar et al. 1999).

The oxidation of lipids can be evaluated by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA). MDA is a dialdehyde formed during the oxidation of polyunsaturated fatty acids such as arachidonic acid (Janero 1990). The thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) test consists of the determination of a pink chromogen, formed by the reaction of MDA with two molecules of thiobarbituric acid in an acidic medium and at elevated temperature (Janero 1990; Vasconcelos et al. 2007). A biomarker to assess the lesion of protein is the carbonyl content of proteins (Halliwell and Whiteman 2004; Matsuyama et al. 2009). Direct oxidation of the amino acid side chain by reactive species allows the introduction of carbonyl groups to protein molecules (Oberget al. 2004). The total antioxidant capacity in biological samples can be evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) test. Plasma contains several antioxidant factors such as ascorbate, urate, α -tocopherol, albumin and the sulfhydryl group of proteins, which are able

to reduce MTT and thus transform it into its final product in which its concentration will be detected by absorption of light (Medina et al. 2007). Ascorbate participates in the organism's antioxidant mechanism and its plasma levels can be determined spectrophotometrically after reduction from Fe⁺³ to Fe⁺² by the antioxidants present in the sample (Vasconcelos et al. 2007; Takahashi et al. 2011).

CKD is silent, and most cases are identified in advanced stages, where dialysis is already required (Bellasi et al. 2019). In childhood, CKD is even more worrying and devastating, greatly compromising the child's quality of life and development. Therefore, efforts must be made to diagnose the disease earlier to prevent its progression. Likewise, the goal of this study was to investigate the hemostasis and oxidative stress in children and adolescents with CKD of different etiologies, aiming to define biomarkers that could be useful for the diagnosis, prediction, and monitoring of the disease.

Materials and methods

Ethical aspects

This study was previously approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (CAAE 07513513.9.0000.5149). All participants or their guardians for proper authorization signed the informed consent form. Relevant clinical and laboratory parameters were collected from medical records.

Study population

First, 84 medical records of children and adolescents diagnosed with CKD treated at the Pediatric Nephrology Unit of the Hospital das Clínicas/UFMG/Brazil were evaluated.

Inclusion and exclusion criteria previously established (Table 1) were applied and 54 participants were selected, which were allocated into three groups and two subgroups according to the etiology and the stage of the disease, respectively, as shown:

Group I (N = 20): Children and adolescents with CKD caused by glomerular diseases, distributed into two subgroups:

- Subgroup IA: CKD stage 1 or 2 (N = 11).
- Subgroup IB: CKD stage 3 or 4 (N = 09).

Group II: Children and adolescents with CKD stage 3 or 4 caused by CAKUT (N = 26).

Group III: Children and adolescents with CKD stage 3 or 4 due to different etiologies—distinct from glomerular disease or CAKUT (N = 08).

Group IV: Created after the results analysis and composed of participants with stage 3 or 4 CKD by any etiology (combination of Subgroup IB and Groups II and III).

Group V: A total of 52 apparently healthy children and adolescents were included as controls, according to the established inclusion and exclusion criteria described in Table 2. These control participants were selected at the elementary and high school/UFMG and were age- and sex-matched.

Table 1. Inclusion and exclusion criteria for children with CKD.

Inclusion criteria for children with CKD	Exclusion criteria for children with CKD
- Diagnosed glomerular disease (Group I)	- Be over 18 years old
- CKD due to glomerular disease in stages 1, 2, 3, or 4 (Group I)	- Be less than 2 years old or underweight
- Be under 18 years old at the time of biological sample collection (Group I)	- CKD with GFR below 15 mL/min/1.73 m ² and (or) on hemodialysis
- CKD due to stage 1 or 2 glomerular disease (Subgroup IA)	- Children with infectious diseases
- CKD due to glomerular disease in stage 3 or 4 (Subgroup IB)	- Children with an infectious and (or) inflammatory process on the date of collection or up to three weeks previously
- Diagnosed CAKUT (Group II)	- Diabetes mellitus
- Be under 18 years old at the time of biological sample collection (Group II)	- Children with other diseases, such as cancer, autoimmune diseases, liver disease, hormonal disorders, and anemia
- Have a diagnosis of CKD, due to different etiologies, neither glomerular disease nor CAKUT, in stage 3 or 4 (Group IV)	- Children with platelet or clotting disorders
- Be under 18 years old at the time of biological sample collection (Group IV)	- Using multivitamin drugs or contraceptive hormones

Table 2. Inclusion and exclusion criteria for the control group.

Inclusion criteria	Exclusion criteria
- Be clinically healthy	- Be over 18 years old
- Age and sex matched with CKD participants	- Be less than 2 years old or underweight
	- Presence of any kidney and urinary tract pathology
	- Presence of infectious diseases, cancer, autoimmune diseases, liver disease, hormonal disorder
	- Presence of an infectious and (or) inflammatory process on the date of collection or up to three weeks previously
	- Diabetes mellitus or other metabolic diseases
	- Platelet or coagulation disorders
	- Using any anti-inflammatory drugs, contraceptive hormones or multivitamins

Blood sampling

Blood samples were collected from all participants using Vacutainer® system tubes: 2 mL in EDTA, 5 mL in 3.2% sodium citrate and 5 mL in a tube without anticoagulant. The samples were centrifuged at 3800 rpm under refrigeration (4 °C) for 20 min and the plasma or serum was aliquoted and stored at -80 °C until use.

Hemostatic markers

Both D-Di and PAI-1 plasma levels were determined using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (Imuclone®, D-Di Kit Sekisui Diagnostics®, and R&D Systems® Inc., respectively) according to the manufacturer's instructions.

Oxidative stress markers

Lipid peroxidation was assessed by the TBARS method according to the following summarized protocol: a mixture containing thiobarbituric acid (1%), sodium hydroxide (0.05 mol/L), butylated hydroxytoluene (0.1 mmol/L) and concentrated phosphoric acid was added to the plasma samples, which were incubated in a dry bath for 25 min at 98 °C and then put in a freezer for 10 min. Subsequently, butanol was added to the tubes, which were vortexed and centrifuged at 2000g for 5 min. The absorbance of the supernatant was mea-

sured in a spectrophotometer at 532 and 600 nm. The concentration of TBARS was calculated using the molar extinction coefficient of 156/(mmol/L × cm). TBARS values are expressed as μmol/L of plasma.

The determination of plasma protein carbonyl content (PCC) was performed by spectrophotometry using the Protein Carbonyl Colorimetric Assay® kit (Cayman Chemical Company) according to the manufacturer's instructions. The technique is based on the reaction between the carbonyl group and 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), with the formation of a colored product. The absorbance reading was performed at 370 nm in the VersaMax Microplate Reader—Molecular Devices®, USA. The PCC was calculated by correcting the absorbance of the sample tube with the absorbance of the respective control tube using the SoftMax Pro® software. Reference values were not provided.

The total antioxidant capacity (TAC) of the samples was investigated through the MTT assay. This test consists of reducing the dye MTT by antioxidants present in the serum with the formation of a colorimetric product, formazan crystals (Medina et al. 2007). A mixture containing the plasma sample, 0.1 mol/L phosphate buffered saline (PBS) and MTT solution (0.5% in PBS) was incubated protected against light at 37 °C for 60 min. Then, a solution of isopropanol: HCl was added, and the samples were vortexed and centrifuged at 3000g for 10

min. The absorbance of the supernatant was read at 570 nm using the VersaMax Microplate Reader—Molecular Devices®, USA.

Ascorbic acid (ascorbate) plasma levels were determined by spectrophotometry using the Ferric Reducing Ascorbate (FRASC)® kit (BioVision) according to the manufacturer's instructions. The test is based on the reduction of Fe⁺³ to Fe⁺² by the antioxidants present in the sample. The absorbance of the solution was read at 593 nm using the VersaMax Microplate Reader—Molecular Devices®, USA. The calculation of plasma ascorbate concentration was performed using a calibration curve made with standards of ascorbic acid of known concentrations using the SoftMax Pro® software.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Prism® software (version 5.0). First, a descriptive analysis was performed. Then, the data were analyzed for their distribution using the Kolmogorov–Smirnov test. The comparison of variables with normal distribution was performed by ANOVA test with Tukey's test (three groups) or Student's *t* test (two groups) and is presented as mean ± standard deviation (SD). Continuous variables that did not follow a normal distribution were analyzed by Kruskal–Wallis test followed by Ranks' test (three groups) or Mann–Whitney U test (two groups) and are presented as median (minimum–maximum values). Values were considered significant when $P \leq 0.05$.

Spearman's correlation was used in the analysis of correlation among the results obtained, etiologies of CKD, and stages of the disease (1, 2, or 3). Correlations with $P \leq 0.05$ were considered significant. Correlation coefficients between 0.3 and 0.7 were considered as weak positive correlations, and those between 0.7 and 0.9 were considered as strong positive correlations. The same parameters were used to establish negative correlations. Cytoscape software (Shannon et al. 2003) was used to generate the interconnected network model and to illustrate the correlation of data in each group.

Results

This study enrolled 106 children and adolescents, 54 of them with CKD and 52 with healthy controls. The participants were allocated into five groups (I–V) and two subgroups (Groups IA and IB). The median age of the participants was 13.5 (10.0–15.0) years old. For the CKD etiology, 20.3% of participants had glomerular disease stage 1 or 2, 16.7% glomerular disease stage 3 or 4, and 14.8% CKD advanced stage (due to different etiologies—distinct from glomerular diseases or CAKUT). The clinical and laboratory data of the participants are shown in Tables 3 and 4.

Table 5 shows the medians of D-Di and PAI-1 levels evaluated in CKD stage 3 or 4 (Group IV) and healthy participants, and Table 6 shows these results for each group of participants.

D-Di plasma levels were lower in Subgroup IA compared with Groups II ($P = 0.026$) and IV ($P = 0.034$) and were higher in Groups II ($P = 0.006$) and IV ($P = 0.003$) compared with Group V. PAI-1 plasma levels were lower in Group II compared with Subgroup IB ($P = 0.037$) and Group V ($P = 0.02$), and lower in Group II com-

pared with Group I ($P = 0.017$). The distribution of D-Di and PAI-1 values for the five groups is shown in Fig. 1.

To assess the influence of the use of angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitors and (or) angiotensin receptor antagonists (ARA), D-Di and PAI-1 levels were compared in CKD children and adolescents who used or did not use these drugs (Table 7).

D-Di levels were higher in participants who did not use ACE inhibitors and (or) ARA when compared with those who used these drugs or the control group (0.0125). Additional analysis showed that the difference was in comparing nonmedicated children and adolescents and the control groups (0.0273). No difference was found comparing the PAI-1 levels among the groups (0.5162).

The D-Di/PAI-1 ratio showed the following values: Group I = 18.3; Subgroup IA = 17.7; Subgroup IB = 17.2; Group II = 31.5; Group III = 40.9; Group IV = 31.4; Group V = 15.3. Subsequently, dividing the ratio for each CKD group by the ratio of Group V (control group), the following values were obtained: Group I = 1.2; Group IA = 1.2; Group IB = 1.1; Group II = 2.0; Group III = 2.67 and Group IV = 2.05.

The evaluation of oxidative stress was assessed by determination of TBARS, protein carbonyl content, plasma antioxidant capacity (MTT) and ascorbate (Table 8). The distribution of oxidative stress markers for the five groups is shown in Fig. 2.

No significant differences were found between the groups for TBARS plasma levels ($P = 0.2461$), plasma antioxidant capacity ($P = 0.7665$) and ascorbate ($P = 0.6605$). Protein carbonyl content plasma levels were lower in Group I and Subgroup IB compared with controls ($P = 0.008$ and $P = 0.004$, respectively).

An integrated network model revealed several correlations among the hemostatic and oxidative stress markers and laboratory parameters (Fig. 3).

Discussion

Our results revealed that D-Di levels were increased in children and adolescents with CAKUT and stage 3 or 4 CKD of any etiology compared with those with early-stage glomerular diseases and healthy controls. Accordingly, Dubin et al. (2011) demonstrated that patients with lower GFR had D-Di levels up to 44% higher than subjects with normal GFR. These researchers suggested that microvascular disease promotes the development and results in increased plasma hemostatic markers. Therefore, the increase in D-Di levels would neither be a cause nor an effect of the reduced GFR, but reflect the microvascular disease consequent to CKD that occurs in advanced stages of the disease regardless of its etiology. Furthermore, the strong negative correlation obtained between D-Di levels and GFR reinforces the premise that high D-Di levels are associated with renal deterioration. Since circulating D-Di fragments are phagocytosed by macrophages (they are not filtered by the kidneys), our data demonstrate the establishment of a prothrombotic state in CKD stage 3, regardless of the underlying disease.

Table 3. Clinical characteristics of the participants ($N = 106$).

Parameters	Group I ($N = 20$)	Subgroup IA ($N = 11$)	Subgroup IB ($N = 09$)	Group II ($N = 26$)	Group III ($N = 08$)	Group IV ($N = 43$)	Group V (control) ($N = 52$)
Age (years)	12.0 (10–14.75)	12.0 (10–14.0)	13.0 (10.5–15.5)	14 (9.7–14.0)	15 (8.5–15.0)	14 (10–15)	11 (10–14)
Sex							
• Female [N (%)]	12 (60%)	7 (64%)	5 (56%)	19 (73%)	2 (25%)	26 (60%)	34 (63%)
• Male [N (%)]	8 (40%)	4 (36%)	4 (44%)	7 (27%)	6 (75%)	17(40%)	20 (37%)
Height percentile	23 (3–45)	28 (16–45)	10 (3–42)	22 (2–50)	8 (1–14)	16 (3–40)	70 (57–93)
Weight percentile	64 (4–79)	74 (52–94)	0 (0–76)	22 (2–50)	2 (0–26)	10 (0–50)	76 (42–95)
BMI (kg/m^2)	18.21 (16.56–24.8)	20.8 (17.6–27.6)	16.67 (15.1–22.5)	16.16 (14.4–19.51)	14.44 (13.86–20.16)	16.20 (14.38–19.49)	19.35 (16.83–21.55)
Blood pressure							
• Systolic	101.7 \pm 12.2	101.4 \pm 13.3	102.1 \pm 11.5	107.9 \pm 11.5	109.7 \pm 14.7	107.2 \pm 12.0	—
• Diastolic	65.3 \pm 10.1	64.0 \pm 8.5	67.1 \pm 12.5	67.1 \pm 11.2	62.9 \pm 11.1	66.3 \pm 11.2	—
Hypertension ^a	13 (65%)	7 (63.6%)	6 (66.7%)	19 (73%)	7 (87.5%)	32 (74%)	—
MEDICATIONS							
Use of at least one hypotensive drug [N (%)]	14 (70%)	8 (72.7%)	6 (66.7%)	18 (69.2%)	7 (87.5%)	31 (72.1%)	—
Angiotensin-converting-enzyme inhibitors	12 (60%)	8 (72.7%)	4 (44.4%)	15 (57.7%)	4 (50%)	23 (53.5%)	—
β -Blockers	0	0	0	1 (3.8%)	0	1 (2.3%)	—
Calcium channel antagonists	3 (15%)	2 (18.2%)	1 (11.1%)	3 (11.5%)	1 (12.5%)	5 (11.6%)	—
Angiotensin receptor antagonists	3 (15%)	3 (27.3%)	0	0	2 (25%)	2 (4.6%)	—
Diuretics	6 (30%)	2 (18.2%)	4 (44.4%)	10 (38.5%)	5 (62.5%)	19 (44.2%)	—
Statins	6 (30%)	2 (18.2%)	4 (44.4%)	0	0	4 (9.3%)	—
Sodium bicarbonate	6 (30%)	0	6 (66.6%)	14 (53.8%)	6 (75%)	26 (60%)	—
Immunosuppressants [N (%)]	12 (60%)	8 (72.7%)	4 (44.4%)	0	0	4 (9.3%)	—
Treatment for anemia ^b	2 (10%)	0	2 (22%)	7 (26.9%)	3 (37.5%)	12 (27.9%)	—

^aBlood pressure (systolic or diastolic) higher than the 95th percentile for sex, age, and height and (or) use of hypotensive medication.

^bUse of erythropoietin and (or) ferrous sulfate.

Although the presence of microvascular disease was not investigated in this study, it cannot be ruled out as a likely cause of increased D-Di levels in CKD children and adolescents at stage 3 or 4 compared with those with early-stage glomerular disease or controls. Besides, it is possible to infer that the prothrombotic state associated with CKD may be related, at least in part, to the acid-base or electrolyte changes observed in this disease, as previously proposed (Dubin et al. 2011). In fact, acid-base alterations were frequently found in pediatric CKD.

The exacerbated inflammatory state previously reported in CKD patients (Mihai et al. 2018) can also justify high D-Di levels in pediatric CKD stage 3 or 4. Our group and others showed that inflammatory cytokines can reduce the ADAMTS13 activity, compromising the von Willebrand factor cleavage and favoring higher platelet aggregation and microthrombus formation, which contributes to higher D-Di levels (Bernardo et al. 2004; Domingueti et al. 2015).

The urinary loss of natural anticoagulants (PC, PS, and antithrombin) due to kidney damage and proteinuria, as previously observed (Kato et al. 2010), could also result in plasma D-Di enhancement. Our group earlier demonstrated high D-

Di and low PAI-1 levels in patients undergoing hemodialysis compared with controls (Rios et al. 2010). Furthermore, Kamitsuji et al. (1988) proposed that the presence of fibrin deposits in the glomeruli of children with glomerular disease suggests that intraglomerular coagulation processes may contribute to the disease advancement. According to our data, previous studies reported that the use of ACE inhibitors and ARA reduced D-Di levels (Cesari et al. 2009; Gamboa et al. 2012). It is known that drugs inhibiting the renin-angiotensin system slow the CKD advance (Lewis et al. 1993). The renoprotective effect attributed to these drugs seems to be independent of their hypotensive activity and it may be related to their anti-inflammatory activities, reduction of proteinuria, and beneficial effects on renal hemodynamics (such as the reduction of glomerular hypertension) (Mende 2010; Molnar et al. 2014). Regarding PAI-1, our data revealed lower levels in CAKUT children and adolescent compared with those with glomerular diseases at different stages, as well as to control group. Our research group and others previously demonstrated a decrease in PAI-1 levels in CKD patients undergoing hemodialysis (Rios et al. 2010; Sameiro-Faria et al. 2013). Knowing that PAI-1 is a fibrinolysis inhibitor that blocks the action of t-PA to activate plasminogen, it could

Table 4. Laboratory parameters evaluated in participants ($N = 106$).

Parameters	Group I ($N = 20$)	Subgroup IA ($N = 11$)	Subgroup IB ($N = 09$)	Group II ($N = 26$)	Group III ($N = 08$)	Group IV ($N = 43$)	Group V (control) ($N = 52$)	P
Red blood cells $\times 10^6$ /mL (N)	4.5 \pm 0.8 ($N = 14$)	4.6 \pm 0.4 ($N = 8$)	4.4 \pm 1.3 ($N = 6$)	4.4 \pm 0.6 ($N = 22$)	4.0 \pm 0.7 ($N = 6$)	4.3 \pm 0.7 ^a ($N = 34$)	4.7 \pm 0.4 ($N = 50$)	0.03
Hemoglobin (g/dL) (N)	12.7 \pm 1.8 ($N = 16$)	13.3 \pm 1.3 ($N = 9$)	11.9 \pm 2.2 ($N = 7$)	12.4 \pm 1.2 ^a ($N = 26$)	11.8 \pm 1.8 ($N = 6$)	12.2 \pm 1.5 ^a ($N = 39$)	13.4 \pm 2.3 ($N = 49$)	0.0008
Hematocrit (%) (N)	35 \pm 6 ($N = 16$)	39 \pm 3 ($N = 9$)	35 \pm 6 ($N = 7$)	38 \pm 4 ($N = 26$)	36 \pm 6 ($N = 6$)	37 \pm 5 ($N = 39$)	40 \pm 4 ($N = 49$)	0.45
Number of platelets $\times 10^3$ /mL (N)	322.7 \pm 143.9 ($N = 15$)	299.1 \pm 64.8 ($N = 9$)	358.2 \pm 220.7 ($N = 6$)	229.7 \pm 69.7 ($N = 23$)	263.7 \pm 134.9 ($N = 6$)	257.6 \pm 123.7 ($N = 35$)	275.1 \pm 61.1 ($N = 50$)	0.0506
Number of leukocytes $\times 10^3$ /mL (N)	8.6 \pm 4.8 ($N = 15$)	7.2 \pm 4.0 ($N = 9$)	10.7 \pm 5.5 ^a ($N = 6$)	6.9 \pm 2.4 ($N = 22$)	8.7 \pm 4.9 ($N = 6$)	7.9 \pm 3.8 ($N = 34$)	5.9 \pm 1.6 ($N = 50$)	0.004
Urea (mg/dL) (N)	47.8 \pm 36.6 ($N = 19$)	23.5 \pm 9.0 ($N = 10$)	74.9 \pm 36.9 ($N = 9$) ^d	72.8 \pm 42.3 ($N = 25$) ^d	86.5 \pm 28.2 ($N = 8$) ^d	75.9 \pm 38.4 ($N = 42$) ^d	—	<0.0001
GFR (mL/min/1.73 m ²) (N)	107.8 (48.3–215.2) ($N = 19$)	208.9 (165.5– 227.5) ^{c,b} ($N = 10$)	48.3 (20.1–56.1) ^a ($N = 9$)	42.9 (27.3–95.4) ^a ($N = 25$)	32.9 (21.1–48.6) ^a ($N = 8$)	40.3 (25.5–65.2) ^a ($N = 42$)	110.8 (102.0–131.0) ($N = 52$)	<0.0001
Creatinine (mg/dL) (N)	0.9 (0.4–2.0) ^b ($N = 19$)	0.4 (0.4–0.6) ($N = 10$)	2.0 (1.3–5.1) ^{a,d} ($N = 9$)	1.9 (1.1–2.9) ^{a,d} ($N = 25$)	2.7 (1.5–3.2) ^{a,d} ($N = 8$)	2.0 (1.2–3.2) ^{a,d} ($N = 42$)	0.8 (0.7–0.9) ($N = 52$)	<0.0001
Sodium (mmol/L) (N)	141.3 \pm 3.3 ($N = 19$)	140.5 \pm 3.0 ($N = 10$)	142.1 \pm 3.5 ($N = 9$)	141.8 \pm 3.0 ($N = 25$)	140.4 \pm 2.9 ($N = 8$)	141.6 \pm 3.1 ($N = 42$)	—	0.7196
Potassium (mmol/L) (N)	4.3 \pm 0.6 ^{b,c} ($N = 19$)	4.4 \pm 0.5 ^c ($N = 10$)	4.3 \pm 0.8 ^c ($N = 9$)	4.9 \pm 0.5 ($N = 26$)	4.6 \pm 0.9 ($N = 8$)	4.7 \pm 0.7 ($N = 43$)	—	0.0256
Chloride (mmol/L) (N)	103.2 \pm 3.2 ($N = 18$)	101.9 \pm 2 ^c ($N = 10$)	104.9 \pm 3.7 ($N = 8$)	106.0 \pm 3.8 ($N = 22$)	102.3 \pm 2.5 ($N = 8$)	105.0 \pm 3.8 ($N = 38$)	—	0.0089
Calcium (mg/dL) (N)	9.1 \pm 1.0 ($N = 18$)	9.5 \pm 0.4 ($N = 10$)	8.9 \pm 1.4 ($N = 8$)	9.7 \pm 0.5 ($N = 26$)	9.6 \pm 0.7 ($N = 8$)	9.5 \pm 0.8 ($N = 42$)	—	0.1639
Phosphorus (mg/dL) (N)	5.2 (4.6–5.8) ($N = 18$)	5.2 (4.6–5.8) ($N = 10$)	5.4 (4.2–5.8) ($N = 8$)	5.3 (5.0–5.5) ($N = 25$)	5.0 (4.2–5.4) ($N = 5$)	5.3 (4.7–5.6) ($N = 38$)	—	0.9368
Uric acid (mg/dL) (N)	4.4 \pm 1.5 ^{b,c} ($N = 11$)	3.5 \pm 0.6 ($N = 6$)	5.4 \pm 1.6 ($N = 5$)	6.8 \pm 1.6 ^d ($N = 22$)	6.2 \pm 1.2 ($N = 4$)	6.5 \pm 1.6 ^d ($N = 31$)	—	<0.0001
Total cholesterol (mg/dL) (N)	161.0 (137.0–194.5) ($N = 17$)	142.5 (134.5–189.3) ($N = 10$)	161.0 (137.0–227.0) ($N = 7$)	155.5 (147.3–189.8) ($N = 18$)	185.0 (148.5–333.0) ($N = 5$)	160.0 (147.8–195.3) ($N = 30$)	—	0.6736
Triglycerides (mg/dL) (N)	84.0 (54.5–135.0) ($N = 17$)	64.5 (51.75–146.3) ($N = 10$)	106.0 (54.0–131.0) ($N = 7$)	91.0 (70.0–143.0) ($N = 19$)	125.0 (111.5–212.0) ($N = 5$)	109.0 (75.0–143.0) ($N = 31$)	—	0.3575

Note: Parametric data are presented as mean \pm standard deviation (comparison by Student's *t* test). Nonparametric data are presented as median (interquartile range) (Mann–Whitney comparison).

^a*P* < 0.05 compared with Group V. ^b*P* < 0.05 compared with Group IV. ^c*P* < 0.05 compared with Group II.

^d*P* < 0.05 compared with Group IA.

Table 5. Hemostatic parameters evaluated in children with stages 3 or 4 CKD and in healthy children.

Parameters	Group IV ($N = 43$)	Group V ($N = 31$)	P
D-Di (ng/mL)	343.7 (162.4–492.3)	191.0 (129.5–287.9)	0.0033 ^a
PAI-1 (ng/mL)	10.96 (9.57–13.83)	12.44 (10.46–15.75)	0.2657

Note: Nonparametric data are presented as median (interquartile range) (Mann–Whitney comparison). Parameters are presented as mean \pm standard deviation (comparison by Student's *t* test).

^a*P* < 0.05 (Mann–Whitney comparison).

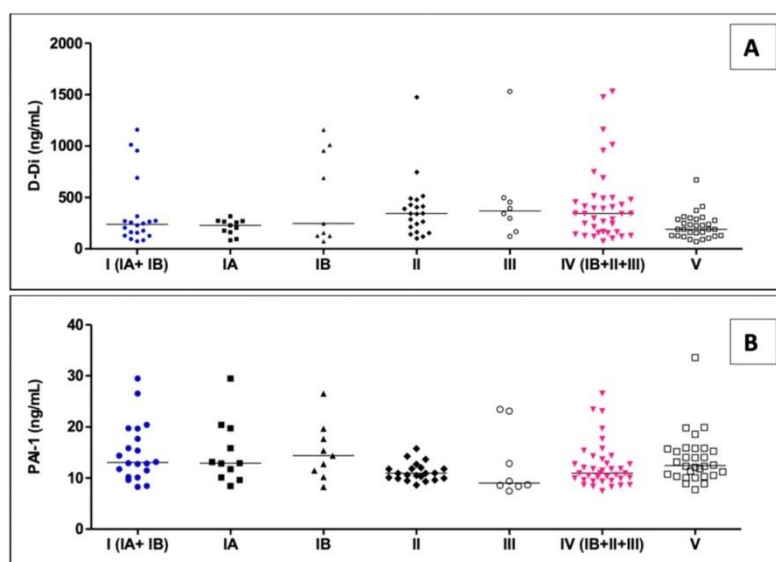
be admitted that its plasma enhancement contributes to the clot's maintenance in the blood vessel (Masson and Angles-Cano 1988). Although Weir and Henrich (2000) proposed that the angiotensin II suppresses the PAI-1 production, no differences were observed comparing PAI-1 levels in pediatric CKD under use of inhibitors of the renin-angiotensin system and those not using these drugs or healthy controls.

It is not possible to discard the hypothesis that the increase in PAI-1 levels in children and adolescents with glomerular disease stage 3 or 4, in comparison to those with CAKUT, is due to differences in the mechanisms of kidney injury and immunological markers, and distinct inflammatory effects in the two main etiologies of CKD in pediatric patients (Becherucci et al. 2016).

Table 6. Hemostatic parameters in the studied participants.

Parameters	Group I (N = 20)	Subgroup IA (N = 11)	Subgroup IB (N = 09)	Group II (N = 21)	Group III (N = 8)	Group IV (N = 43)	Group V (N = 31)	P
D-Di (ng/mL)	238.7 (136.5–306.2)	229.3 (162.6– 271.1) ^{a,b}	248.2 (128.2–983.6)	344.8 (189.3–454.2) ^c	368.5 (200.1–487.6)	343.7 (162.4– 492.3) ^{c,d}	191.0 (129.5– 287.9) ^{a,b}	0.0233
PAI-1 (ng/mL)	13.04 (10.53–19.18) ^b	12.92 (10.12–19.75)	14.40 (10.84–18.68) ^b	10.94 (9.95–11.96)	9.02 (8.44–20.54)	10.96 (9.57–13.83)	12.44 (10.46–15.75) ^b	0.0358

Note: Nonparametric data are presented as median (interquartile range) (Mann-Whitney comparison). Parameters are presented as mean \pm standard deviation (comparison by Student's *t* test).
^aP < 0.05 compared with Group IV (Mann-Whitney comparison). ^bP < 0.05 compared with Group II (Mann-Whitney comparison). ^cP < 0.05 compared with Group V (Mann-Whitney comparison). ^dP < 0.05 compared with Subgroup IA (Mann-Whitney comparison).

Fig. 1. Distribution of plasma levels of D-Di and PAI-1 in the five groups. (A) Distribution of D-Di values in the five groups. (B) Distribution of PAI-1 values in the five groups. The horizontal lines represent the medians for each group.**Table 7.** Hemostasis parameters in CKD participants and control group in relation to medication use.

Parameters	CKD ACE inhibitors/ARA (+) (N = 32)	CKD ACE inhibitors/ARA (-) (N = 17)	Group V (N = 30)	P
D-Di (ng/mL)	261.4 (162.9–409.6)	344.8* (201.4–594.2)	191.0 (129.5–287.9)	0.0125
PAI-1 (ng/mL)	10.96 (9.52–14.01)	11.86 (10.17–16.54)	12.44 (10.46–15.75)	0.5162

*P < 0.05 compared with Group V (Mann-Whitney comparison). CKD ACE inhibitors/ARA (-): children with CKD who were not using an angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor antagonist. CKD ACE inhibitors/ARA (+): children with CKD who were using angiotensin-converting enzyme inhibitor(s) and (or) angiotensin receptor antagonist(s).

The ratio (D-Di/PAI-1 CKD groups)/(D-Di/PAI-1 Control group) allows us to infer that participants with early and advanced glomerular diseases were 20% and 10% more hypercoagulable, respectively, compared with healthy participants. CAKUT participants, on the other hand, were 100% more hypercoagulable and those with CKD of other etiolo-

gies were 167%. The group of participants with severe CKD (group IV = IB + II + III) was 105% more hypercoagulable.

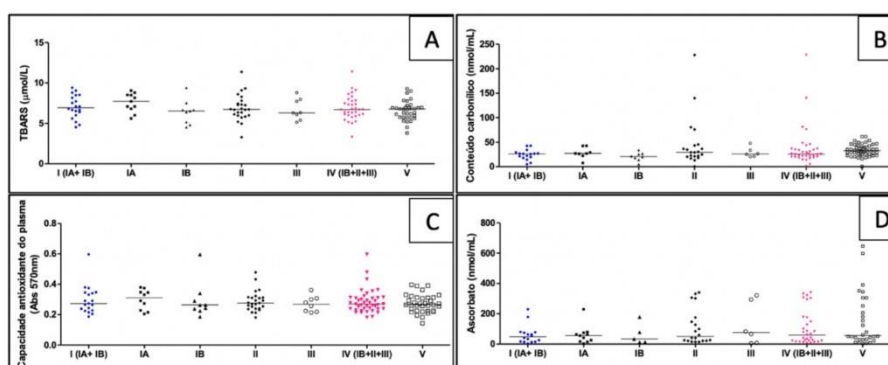
Regarding the oxidative stress, TBARS levels showed no difference between the pediatric CKD groups and controls. A literature search revealed divergent results. Maciejczyk et al. (2018) found a significant increase in oxidative stress markers

Table 8. Results for oxidative stress markers.

Parameters	Group I (N = 20)	Group IA (N = 11)	Group IB (N = 9)	Group II (N = 26)	Group III (N = 8)	Group IV (N = 43)	Group V (N = 52)	P
TBARS (molar extinction coefficient $\mu\text{mol/L}$)	7.055 \pm 1.415	7.581 \pm 1.149	6.411 \pm 1.503	6.938 \pm 1.610	6.720 \pm 1.305	6.885 \pm 1.525	6.586 \pm 1.180	0.2461
Protein carbonyl content (nmol/mL)	26.02 (18.41–28.69) ^a	27.10 (23.36–39.26)	20.68 (15.14–26.56) ^a	29.43 (20.91–44.43)	25.97 (21.22–37.08)	25.79 (20.45–36.70)	32.84 (25.12–42.45)	0.0202
Plasma antioxidant capacity (MTT) (Abs 570 nm)	0.273 (0.228–0.346)	0.311 (0.225–0.355)	0.264 (0.232–0.316)	0.277 (0.240–0.314)	0.268 (0.220–0.306)	0.270 (0.238–0.312)	0.265 (0.225–0.313)	0.7665
Ascorbate (nmol/mL)	0.27 (0.23–0.35)	55.55 (16.87–74.07)	33.98 (13.58–128.7)	50.62 (21.93–168.70)	75.07 (7.18–301.10)	60.08 (21.40–175.60)	56.54 (28.40–305.00)	0.6605

^aP < 0.05 compared with Group V. Abs = absorbance.

Fig. 2. Distribution of oxidative stress markers evaluated in the five groups. (A) Distribution of TBARS values ($\mu\text{mol/L}$) in the five groups. (B) Distribution of carbonyl protein content (nmol/mL) in the five groups. (C) Distribution of plasma antioxidant capacity (Abs 570 nm) in the five groups. (D) Distribution of ascorbate values (nmol/mL) in the five groups. The horizontal lines indicate the medians obtained.



(such as MDA) in the saliva of CKD children compared with the controls. On the other hand, Jacobson *et al.* (2020) observed no significant relationship between urinary oxidative stress markers with worsening glomerular filtration rate. In a study carried out in animal models, Gyurászová *et al.* (2019) found a state of severe oxidative stress in mice with CKD and acute kidney injury. However, for TBARS plasma levels, no difference was obtained between the groups of animals.

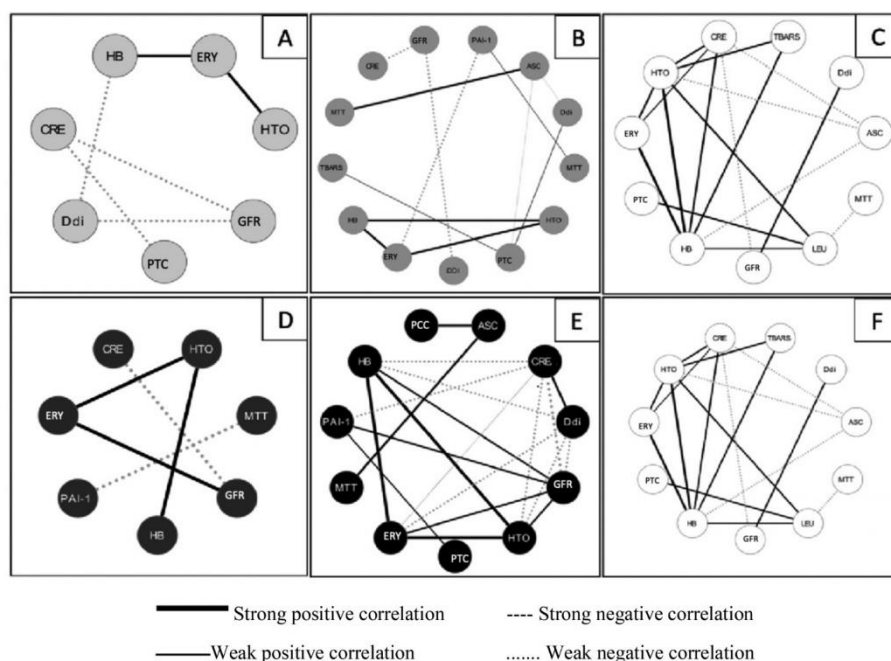
Our findings did not show any difference in the plasma antioxidant capacity or ascorbate levels among the CKD or control groups. However, a positive correlation was observed between the plasma levels of these two markers in children and adolescents with glomerular disease stage 3 or 4 and those with CKD stage 3 or 4. This allows us to infer that in more advanced stages of CKD, antioxidant levels, such as ascorbate, may influence the plasma antioxidant capacity or the body's ability to respond to oxidative stress.

Surprisingly, protein carbonyl content was decreased in children and adolescents with glomerular disease stage 3 or 4

compared with the controls. However, it is important to note that proteinuria is a key feature of glomerular disease, and urinary protein carbonyl content has already been detected in children with nephrotic syndrome (Gopal *et al.* 2017). It may explain the decreased levels of protein carbonyl content found in children and adolescents with advanced glomerular disease. Besides that, it was the only marker of oxidative stress that showed a significant difference when comparing pediatric CKD to the control group. Therefore, it could be proposed that protein carbonyl content is not a good marker of oxidative stress in patients with proteinuria.

An exhaustive search in the literature revealed only a few studies that evaluated this parameter in pediatric CKD. Drożdż *et al.* (2016) found no difference comparing protein carbonyl content among CKD stages 1 to 5 children, as well as most of the oxidative stress biomarkers assessed. The authors suggest that the nonincrease of this parameter in CKD children, when compared with adults, may be due to the different etiologies of CKD in the two age groups.

Fig. 3. Correlation analysis among hemostasis, oxidative stress, and laboratory parameters for all groups: (A) Subgroup IA; (B) Subgroup IB; (C) Group II; (D) Group III; (E) Group IV; (F) Group V.



HB, hemoglobin; PCC, protein carbonyl content; PTC, platelet count; ERY, erythrocyte count; HTO, hematocrit; CRE, creatinine; TVARS, thiobarbituric acid reactive substances; D-DI, D-dimer; ASC, ascorbate; MTT, plasma antioxidant capacity; LEU, leukocyte count; GFR, glomerular filtration rate.

The network model shows a strong positive correlation between the erythrocytes, hemoglobin and hematocrit for all groups (CKD and control). This suggests that the etiology of anemia of pediatric CKD was probably associated with erythropoietin deficiency, which results in a proportional reduction in erythrogram parameters.

A weak positive correlation was detected between the creatinine plasma levels and hemoglobin in pediatric CKD stage 3 or 4 caused by CAKUT. This could be justified by the differences among CAKUT and other kidney diseases. It is known that glomerular diseases are risk factors for end-stage CKD advance and that the inflammatory profile in CAKUT and glomerular diseases shows vital differences (Cerqueira et al. 2014; Simões e Silva et al. 2014). It is also believed that, although the biochemical, molecular, and cellular mechanisms of obstructive uropathies are not completely understood, cytokines and chemokines participate in the CAKUT pathophysiology (Simões e Silva et al. 2013). Thus, a possible role of cytokines in cell differentiation in the bone marrow has been proposed (Borish and Steinke 2003). It can be inferred that the difference observed in the correlation between creatinine

and hemoglobin levels for pediatric CAKUT is related to differences in inflammatory process, mechanisms of CKD progression, and the bone marrow response reported for these patients.

An expansion in the connections among hemostatic and oxidative stress markers in pediatric CKD was found, which probably reflects the complexity of kidney diseases. The intricacy in understanding the circulating levels of these markers, knowing the possibility of their loss in the urine, should be highlighted.

There is a lack of data in the literature on hemostatic and oxidative stress biomarkers associated with CKD in the pediatric population. The extrapolation of research data obtained in adults to children and adolescents may incur errors for not considering the age, sex and weight of this population to establish reference values. It should be pointed out that the cross-sectional design of our study may offer restrictions to define the causal relationship between findings. However, this kind of study is useful to motivate longitudinal studies enrolling children and adolescents with CKD, which may clarify the occurrence of cardiovascular and thrombotic compli-

cations. In addition, it can define biomarkers as prognostic tools for the follow-up of these patients to benefit their quality of life and development.

Acknowledgment

The authors thank CAPES, FAPEMIG and CNPq/Brazil.

Article information

History dates

Received: 16 November 2021

Accepted: 11 January 2022

Accepted manuscript online: 25 May 2022

Version of record online: 31 August 2022

Copyright

© 2022 The Author(s). Permission for reuse (free in most cases) can be obtained from copyright.com.

Author information

Author ORCIDiDs

Ana Cristina dos Santos Lopes <https://orcid.org/0000-0001-9222-3882>

Funding

This study was supported by FAPEMIG under grant number 00764-16 and CNPq/Brazil under grant number 404353/2016-9.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Becherucci, F., Roperto, R., Materassi, M., and Romagnani, P. 2016. Chronic kidney disease in children. *Clin. Kidney J.* 9(4): 583–591. doi:10.1093/ckj/sfw047. PMID: 27478602.
- Belangero, V., Prates, L., Watanabe, A., Schwartsman, B., Nussenzeig, P. Cruz, N., et al. 2018. Prospective cohort analyzing risk factors for chronic kidney disease progression in children. *J. Pediatr.* 94(5): 525–531. doi:10.1016/j.jpeds.2017.07.015. PMID: 28982638.
- Bellasi, A., Di Lullo, L., and Di Iorio, B. 2019. Chronic kidney disease: the silent epidemic. *J. Clin. Med.* 8(11): 1795. doi:10.3390/jcm8111795.
- Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Moake, J., and Dong, J. 2004. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von willebrand factor multimers under flow. *Blood*, 104(1): 100–106. doi:10.1182/blood-2004-01-0107. PMID: 15026315.
- Borish, L., and Steinke, J. 2003. 2. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111(2): S460–S475. doi:10.1067/mai.2003.108. PMID: 12592293.
- Cerqueira, D., Soares, C., Silva, V., Magalhães, J., Barcelos, I. Duarte, M., et al. 2014. A predictive model of progression of CKD to ESRD in a predialysis pediatric interdisciplinary program. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9(4): 728–735. doi:10.2215/CJN.06630613. PMID: 24458086.
- Cesari, M., Kritchevsky, S., Atkinson, H., Penninx, B., Bari, M., Tracy, R., and Pahor, M. 2009. Angiotensin-converting enzyme inhibition and novel cardiovascular risk biomarkers. *Am. Heart J.* 157(2): 334.e1–334.e8. doi:10.1016/j.ahj.2008.10.026.
- D'Agati, V., Kaskel, F., and Falk, R. 2011. Focal segmental glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 365(25): 2398–2411. doi:10.1056/NEJMr1106556. PMID: 22187987.
- Dart, A., Ruth, C., Sellers, E., Au, W., and Dean, H. 2015. Maternal diabetes mellitus and congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in the child. *Am. J. Kidney Dis.* 65(5): 684–691. doi:10.1053/j.ajkd.2014.11.017. PMID: 25595566.
- Domingueti, C., Dusse, L., Fóscolo, R., Reis, J., Annichino-Bizzacchi, J., Orsi, F., et al. 2015. Von willebrand factor, ADAMTS13 and D-Dimer are correlated with different levels of nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *PLoS One*, 10(7): e0132784. doi:10.1371/journal.pone.0132784. PMID: 26168189.
- Drożdż, D., Kwinta, P., Sztelfko, K., Kordon, Z., Drożdż, T., Łatka, M., et al. 2016. Oxidative stress biomarkers and left ventricular hypertrophy in children with chronic kidney disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016: 1–8. doi:10.1155/2016/7520231.
- Dubin, R., Cushman, M., Folsom, A., Fried, L., Palmas, W., Peralta, C., et al. 2011. Kidney function and multiple hemostatic markers: cross sectional associations in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *BMC Nephrol.* 12(1): 1–8. doi:10.1186/1471-2369-12-3. PMID: 21235763.
- Gaffney, P., Creighton, L., Callus, M., and Thorpe, R. 1988. Monoclonal antibodies to crosslinked fibrin degradation products (XL-FDP) II. Evaluation in a variety of clinical conditions. *Br. J. Haematol.* 68(1): 91–96. doi:10.1111/j.1365-2141.1988.tb04184.x. PMID: 3345298.
- Gamboa, J., Pretorius, M., Todd-Tzanetos, D., Luther, J., Yu, C., Ikizler, T., and Brown, N. 2012. Comparative effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin-receptor blockade on inflammation during hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23(2): 334–342. doi:10.1681/ASN.2011030287. PMID: 22158433.
- Gopal, N., Koner, B., Bhattacharjee, A., Bhat, V., Murugaiyan, S., and Muddegowda, P. 2017. Assay of urinary protein carbonyl content can predict the steroid dependence and resistance in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 28(2): 268. doi:10.4103/1319-2442.202764. PMID: 28352006.
- Gyurászová, M., Kovalčíková, A., Renczés, E., Kmeťová, K., Celec, P., Bábíčková, J., and Tóthová, Ľ. 2019. Oxidative stress in animal models of acute and chronic renal failure. *Dis. Markers*, 2019: 1–10. doi:10.1155/2019/8690805.
- Halliwel, B., and Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142(2): 231–255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776. PMID: 15155533.
- Himmelfarb, J., Stenvinkel, P., Ikizler, T. A., and Hakim, R. M. 2002. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* 62(5): 1524–1538. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00600.x. PMID: 12371953.
- Jacobson, M., Liu, M., Wu, Y., Furth, S., Warady, B., Trachtman, H., and Trasande, L. 2020. Oxidant stress and renal function among children with chronic kidney disease: a repeated measures study. *Sci. Rep.* 10(1): 278715. doi:10.1038/s41598-020-59962-9.
- Janero, D. R. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9(6): 515–540. doi:10.1016/0891-5849(90)90131-2. PMID: 2079232.
- Kamitsuji, H., Sakamoto, S., Matsunaga, T., Taira, K., Kawahara, S., and Nakajima, M. 1988. Intraglomerular deposition of fibrin/fibrinogen-related antigen in children with various renal diseases. *Am. J. Pathol.* 133(1): 61. PMID: 3052094.
- Kato, S., Chernyavsky, S., Tokita, J., Shimada, Y., Homei, P., Rosen, H., and Winchester, J. 2010. Relationship between proteinuria and venous thromboembolism. *J. Thromb. Thrombolysis*, 30(3): 281–285. doi:10.1007/s11239-010-0442-z. PMID: 20157844.
- Lewis, E., Hunsicker, L., Bain, R., and Rohde, R. 1993. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 329(20): 1456–1462. doi:10.1056/NEJM19931113292004. PMID: 8413456.
- Maciejczyk, M., Szulimowska, J., Skutnik, A., Taranta-Janusz, K., Wasilewska, A., Wiśniewska, N., and Zalewska, A. 2018. Salivary biomarkers of oxidative stress in children with chronic kidney disease. *J. Clin. Med.* 7(8): 209. doi:10.3390/jcm7080209.
- Masson, C., and Angles-Cano, E. 1988. Kinetic analysis of the interaction between plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator. *Biochem. J.* 256(1): 237–244. doi:10.1042/bj2560237. PMID: 3146972.

- Matsuyama, Y., Terawaki, H., Terada, T., and Era, S. 2009. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.* **13**(4): 308–315. doi:10.1007/s10157-009-0161-y. PMID: 19363646.
- Medina, L., Veloso, C., de Abreu Borges, É., Isoni, C., Calsolari, M., Chaves, M., and Nogueira-Machado, J. 2007. Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **77**(2): 193–197. doi:10.1016/j.diabres.2006.12.008. PMID: 17270309.
- Mende, C. 2010. Application of direct renin inhibition to chronic kidney disease. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **24**(2): 139–149. doi:10.1007/s10557-010-6232-1. PMID: 20490905.
- Mihai, S., Codrici, E., Popescu, I., Enciu, A., Albuiescu, L., Necula, L., et al. 2018. Inflammation-related mechanisms in chronic kidney disease prediction, progression, and outcome. *J. Immunol. Res.* **2018**: 1–16. doi:10.1155/2018/2180373.
- Molnar, M., Kalantar-Zadeh, K., Lott, E., Lu, J., Malakauskas, S. Ma, J., et al. 2014. Angiotensin-converting enzyme inhibitor, angiotensin receptor blocker use, and mortality in patients with chronic kidney disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**(7): 650–658. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.050. PMID: 24269363.
- Monteverde, M., Paz, M., Ibáñez, J., Chaparro, A., Solernou, V., Sager, C., et al. 2020. Kidney transplantation in children with CAKUT and non-CAKUT causes of chronic kidney disease: do they have the same outcomes?. *Pediatr. Transpl.* **24**(8): e13763. doi:10.1111/ptr.13763. PMID: 33012072.
- National Kidney Foundation. 2002. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* **39**(2 Suppl. 1): S1–S266. PMID: 11904577.
- Nicolaou, N., Renkema, K., Bongers, E., Giles, R., and Koores, N. 2015. Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**(12): 720–731. doi:10.1038/nrneph.2015.140. PMID: 26281895.
- Oberg, B. P., McMenamin, E., Lucas, F. L. E. E., McMonagle, E., Morrow, J., Ikizler, T. A. L. P., and Himmelfarb, J. 2004. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* **65**(3): 1009–1016. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00465.x. PMID: 14871421.
- Ott, P., Astrup, L., Jensen, R., Nyeland, B., and Pedersen, B. 1988. Assessment of D-dimer in plasma: diagnostic value in suspected deep venous thrombosis of the leg. *Acta Med. Scand.* **224**(3): 263–267. doi:10.1111/j.0954-6820.1988.tb19371.x. PMID: 3239455.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., et al. 2017. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**: 1–13. doi:10.1155/2017/8416763.
- Rios, D., Carvalho, M., Iwaleed, B., Simões e Silva, A., Borges, K., and Dusse, L. 2010. Hemostatic changes in patients with end stage renal disease undergoing hemodialysis. *Clin. Chim. Acta.* **411**(3–4): 135–139. doi:10.1016/j.cca.2009.11.022.
- Sameiro-Faria, M., Ribeiro, S., Costa, E., Mendonça, D., Teixeira, L. Rocha-Pereira, P., et al. 2013. Risk factors for mortality in hemodialysis patients: two-year follow-up study. *Dis. Markers.* **35**(6): 791–798. doi:10.1155/2013/518945. PMID: 24347799.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., et al. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**(11): 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303. PMID: 14597658.
- Simões e Silva, A., Pereira, A., Teixeira, M., and Teixeira, A. 2014. Chemokines as potential markers in pediatric renal diseases. *Dis. Markers.* **2014**: 1–9. doi:10.1155/2014/278715.
- Simões e Silva, A., Valério, F., Vasconcelos, M., Miranda, D., and Oliveira, E. 2013. Interactions between cytokines, congenital anomalies of kidney and urinary tract and chronic kidney disease. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**: 1–14. doi:10.1155/2013/597920.
- Takahashi, N., Morimoto, S., Okigaki, M., Seo, M., Someya, K., Morita, T., et al. 2011. Decreased plasma level of vitamin c in chronic kidney disease: comparison between diabetic and non-diabetic patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**(4): 1252–1257. doi:10.1093/ndt/gfq547.
- Templar, J., Kon, S. P., Milligan, T. P., Newman, D. J., and Raftery, M. J. 1999. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**(4): 946–951. doi: 10.1093/ndt/14.4.946. PMID: 10328476.
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., and Kubota, L. T. 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química nova.* **30**(5): 1323–1338. doi:10.1590/S0100-40422007000500046.
- Weir, M., and Henrich, W. 2000. Theoretical basis and clinical evidence for differential effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor subtype 1 blockers. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **9**(4): 403–411. doi:10.1097/00041552-200007000-00012. PMID: 10926177.

ARTIGO 2 - Pediatric chronic kidney disease: blood cell count indexes as inflammation markers

SILVA, Aislander Junio da; LOPES, Ana Cristina dos Santos; MOTA, Ana Paula Lucas; SILVA, Ana Cristina Simões e; DUSSE, Luci Maria Sant'Ana; ALPOIM, Patrícia Nessralla. Pediatric chronic kidney disease: blood cell count indexes as inflammation markers. *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 45, p. 458-469, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2022-0190en>

Artigo publicado no Brazilian Journal of Nephrology (Qualis C) em 2023.


Pediatric chronic kidney disease: blood cell count indexes as inflammation markers


Doença renal crônica pediátrica: índices de contagem de células sanguíneas como marcadores de inflamação


Authors


Aislander Junio da Silva¹ 

Ana Cristina dos Santos Lopes¹ 

Ana Paula Lucas Mota¹ 

Ana Cristina Simões e Silva² 

Luci Maria Sant' Ana Dusse¹ 

Patrícia Nessler Alpoim¹ 

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Belo Horizonte, MG, Brazil.

²Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Departamento de Pediatria, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Submitted on: 01/02/2023.

Approved on: 06/11/2023.

Published on: 11/10/2023.

Correspondence to:

Patrícia Nessler Alpoim.

Email: patnessralla@yahoo.com.br

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2022-0190en>

ABSTRACT

Introduction: Chronic kidney disease (CKD) is defined as a progressive decline of kidney functions. In childhood, the main triggering factors are congenital anomalies of the kidneys and urinary tract (CAKUT) and glomerulopathies. Inflammatory responses present challenges for diagnosis and staging, which justifies studies on biomarkers/indexes. **Aim:** To define blood cell count indexes and verify their association with pediatric CKD etiology and staging. The included indexes were: Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR), Derived Neutrophil-Lymphocyte Ratio (dNLR), Lymphocyte-Monocyte Ratio (LMR), Systemic Inflammation Response Index (SIRI), Aggregate Index of Systemic Inflammation (AISI), and Systemic Immune-Inflammation Index (SII). **Methods:** We determined the indexes in 52 pediatric CKD patients and 33 healthy controls by mathematical calculation. CKD patients were separated in five groups based on the etiology and staging: Group IA: glomerulopathies at stage 1 or 2; IB: glomerulopathies at stage 3 or 4; IIA: CAKUT at stage 1 or 2; IIB: CAKUT at stage 3 or 4; and III: stages 3 or 4 of other etiologies. In addition, we combined all patients with CKD in one group (IV). Group V was a healthy control group. **Results:** Lower values of LMR were observed for groups IB and IIB compared to group V ($p = 0.047$, $p = 0.031$, respectively). Increased values of SIRI were found for group III versus group V ($p = 0.030$). There was no difference for other indexes when the groups were compared two by two. **Conclusion:** The LMR and SIRI indexes showed promising

RESUMO

Introdução: Doença renal crônica (DRC) é definida como um declínio progressivo das funções renais. Na infância, os principais fatores desencadeantes são anomalias congênitas dos rins e trato urinário (CAKUT) e glomerulopatias. Respostas inflamatórias apresentam desafios para diagnóstico e estadiamento, o que justifica estudos sobre biomarcadores/índices. **Objetivo:** Definir índices de contagem de células sanguíneas e verificar sua associação com etiologia e estadiamento da DRC pediátrica. Os índices incluídos foram: Razão Neutrófilo-Linfócito (NLR), Razão Neutrófilo-Linfócito Derivada (dNLR), Razão Linfócito-Monócito (LMR), Índice de Resposta à Inflamação Sistêmica (SIRI), Índice Agregado de Inflamação Sistêmica (AISI) e Índice de Inflamação Imune Sistêmica (SII). **Métodos:** Determinamos índices em 52 pacientes pediátricos com DRC e 33 controles saudáveis por cálculo matemático. Pacientes com DRC foram separados em cinco grupos conforme etiologia e estadiamento: Grupo IA: glomerulopatias em estágio 1 ou 2; IB: glomerulopatias em estágio 3 ou 4; IIA: CAKUT em estágio 1 ou 2; IIB: CAKUT em estágio 3 ou 4; e III: estágios 3 ou 4 de outras etiologias. Além disso, combinamos todos os pacientes com DRC em um grupo (IV). Grupo V foi um grupo controle saudável. **Resultados:** Observamos valores menores de LMR nos grupos IB e IIB comparados ao grupo V ($p = 0,047$; $p = 0,031$, respectivamente). Encontramos valores maiores de SIRI para o grupo III versus grupo V ($p = 0,030$). Não houve diferença para outros índices quando os grupos foram comparados dois a dois. **Conclusão:** Os índices LMR e SIRI apresentaram resultados promissores na avaliação da inflamação,



results in the evaluation of inflammation, as they correlated with CKD etiologies and specially staging in these patients.

pois correlacionaram-se com as etiologias da DRC e, principalmente, com o estadiamento desses pacientes.

Keywords: Renal Insufficiency, Chronic; Pediatric; Nephrology Inflammation; Blood Cell Counts, White; Biomarkers.

Descritores: Insuficiência Renal Crônica; Pediátrico; Inflamação Nefrológica; Contagem de células sanguíneas brancas; Biomarcadores.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by the loss of kidney function associated with histological abnormalities for more than three months. In the Brazilian population, CKD has a prevalence of 1.5%, which means that 3 to 6 million Brazilians are carriers of CKD¹⁻³. Children are less affected than adults. The incidence of CKD in children varies due to the difficulty in diagnosis and the criteria used to establish disease stage. Undoubtedly, establishing epidemiology data of CKD in pediatric patients is a challenge. The estimated prevalence of CKD in Brazilian children and adolescents is approximately 20 cases per million^{3,4,39}.

In adults, CKD etiology frequently involves diabetes mellitus and high blood pressure, whereas in children and adolescents the main triggering factors are congenital anomalies of the kidneys and urinary tract (CAKUT) and glomerular diseases^{5-7,40}. A number of factors can cause CAKUT, with genetic factors, renal hypoplasia and dysplasia, and obstructive uropathies being the most common^{4-6,38}.

Although there is no definitive cause for the progression of CKD and its complications, the disease seems to be multifactorial. Studies have suggested that hyper-reactivation of inflammatory cells and immunologic responses of neutrophils and lymphocytes may take place through the release of inflammatory cytokines and autoantibodies, which leads to tissue destruction and renal failure⁸⁻¹⁰.

As the inflammatory process is commonly associated with the progression of chronic diseases, markers for early disease diagnosis have been intensively sought after. Changes in the values of hematological parameters, including red cell distribution width

(RDW), mean platelet volume (MPV), and plateletcrit (PCT) are known as systemic inflammatory response (SIR) markers¹¹⁻¹³. These markers have been separately investigated in patients with CKD,^{11,14} and while some seemed to be helpful in predicting the presence or severity of the disease and its association to inflammatory process^{13,15,16}, others did not^{9,14}.

In recent years, ratios obtained by mathematical calculation using hemogram parameters have been proposed as potential inflammatory markers. These blood cells count indexes include: Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR) = Neutrophils / Lymphocytes; Derived Neutrophil-Lymphocyte Ratio (dNLR) = Neutrophils / (Global Leukocytes – Neutrophils); Lymphocyte-Monocyte Ratio (LMR) = Lymphocytes/Monocytes; Systemic Inflammation Response Index (SIRI) = Neutrophils × Monocytes / Lymphocytes; Aggregate Index of Systemic Inflammation (AISI) = Neutrophils × Monocytes × Platelets / Lymphocytes and Systemic Immune-Inflammation Index (SII) = Platelets × Neutrophils / Lymphocytes.

The NLR seems to be of prognostic and predictive value, especially in systemic inflammation^{11,14}. The increase in NLR values is a risk factor for mortality in inflammatory and infectious diseases, acute coronary syndrome, cardiovascular diseases (CVD), CKD, neoplasms, appendicitis, and COVID-19¹¹.

NLR is an excellent index that is correlated to the progression of CKD, presenting an inversely proportional value to the glomerular filtration rate (GFR), where the higher the value of NLR, the lower the GFR¹⁴. dNLR is a modified NLR, also used to identify systemic inflammation, where higher values

are associated with systemic chronic inflammatory diseases and various types of neoplasms such as gastrointestinal, lungs, breast, and kidneys¹⁵.

LMR is considered a good inflammatory marker that has a low cost and is easy to apply compared to markers such as IL-6, IL-1-b, TNF- α , and thrombomodulin¹⁶. LMR was proposed not only as a marker of inflammatory processes, but also as a marker of endothelial dysfunction, and has prognostic and predictive value for conditions such as metabolic syndromes, CVD, thyroid dysfunction, liver and kidney diseases, and general chronic inflammation. This marker also shows great applicability in clinical studies involving patients with kidney alterations^{12,16}.

Lower LMR values are associated with neoplasms and inflammation, mainly with a worse prognosis¹². SIRI has prognostic and predictive value in several neoplastic and systemic inflammatory conditions. Higher values indicate greater progression of the inflammatory status in chronic diseases, revealing a worse prognosis^{13,17}. Recently, in a multicenter study, AISI was a predictor for severity and intensive care unit admission in COVID-19 patients and SII was a predictor of survival¹⁴.

In this study, we evaluated NLR, dNLR, LMR, SIRI, AISI, and SII in pediatric CKD patients, aiming to define their use in predicting disease severity. To the best of our knowledge, this is the first time that these markers have been combined in a study.

METHODS

ETHICAL ASPECTS

This study was previously approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Minas Gerais (CAAE – 07513513.9.0000.5149). The objectives of our study were clearly explained by the researchers to all the participating children and their parents. Clinical data were collected from medical records and biological samples were obtained from each participant.

STUDY POPULATION

Pediatric patients were selected at the Pediatric Nephrology Unit of Hospital das Clínicas - UFMG in 2013 and 2014. Initially, medical records from 84 patients were analyzed, and based on the inclusion and exclusion criteria, a total of 52 pediatric patients with pre-dialysis CKD were included in the study.

The inclusion criteria were having a diagnosis of CKD regardless of the etiology in stages between 1 and 4 and being up to 18 years of age. The exclusion criteria were the presence of acute bacterial or virus infection, allergies, fever, or other signs and symptoms suggestive of acute infection, and acute metabolic or clinical alterations at the time of blood cells count and hemogram-derived indexes evaluation. We also excluded patients with glomerulopathies during disease relapses and under the use of corticosteroids or other immunosuppressive medications at the time of blood cells count and hemogram-derived indexes evaluation.

In clinical practice, the diagnosis and staging of CKD is confirmed if the patient presents a GFR below 60 mL/min/1.73m² for three consecutive months combined with alteration of any kidney injury marker or imaging test evidence. The classification of CKD (Table s1) according to stages allows patients to receive more effective treatments^{1,18}. Our pediatric patients with CKD are followed-up in a multidisciplinary outpatient service according to a specific protocol. This protocol includes routine exams to evaluate kidney function parameters, hydroelectrolyte and acid base alterations, bone and mineral metabolism, blood counts, iron metabolism, and exclude common viral (cytomegalovirus, Epstein Barr virus, and others based on clinical signs and symptoms) and bacterial infections (urine culture was performed periodically in patients with CAKUT and in any case of fever or other signs and symptoms of urinary tract infection).

Considering the previously established inclusion and exclusion criteria, 52 pediatric patients with CKD were included in the study, and 31 were excluded because they did not fit the profile (Table s2). The medical records were analyzed, and clinical and laboratory data were extracted to create a database.

The control group consisted of 33 age- and sex-matched healthy children and adolescents selected at the Pedagogical Center and at the UFMG Technical College, according to inclusion and exclusion criteria (Table s3).

Finally, our database was composed of 85 subjects, being 52 pediatric patients with CKD and 33 healthy controls. The etiologies of CKD in the patients of this study included CAKUT, glomerulopathies, cystic diseases, and tubulopathies. CKD stages range from 1 to 4. Stages 1 and 2 were considered as early-stage

disease and 3 and 4 as advanced stage disease. According to CKD etiology and stage, the patients were distributed in groups (IA, IB, IIA, IIB, III, and V), defined as:

- Group IA (N = 12) - Patients with stage 1 or 2 CKD caused by glomerulopathies;
- Group IB (N = 08) - Patients with stage 3 or 4 CKD caused by glomerulopathies;
- Group IIA (N = 19) - Patients with stage 1 or 2 CKD caused by CAKUT;
- Group IIB (N = 16) - Patients with stage 3 or 4 CKD caused by CAKUT;
- Group III (N = 07) - Patients with CKD in stages 3 or 4 of etiologies other than glomerular disease or CAKUT, such as tubulopathies, cystic diseases, or others.
- Group V (N = 33) - Healthy children.

In addition, a larger group (Group IV - N = 52) composed of all subgroups regardless of CDK etiology was created.

BLOOD CELL COUNT AND HEMOGRAM-DERIVED INDEXES
The blood cell count data for pediatric CDK patients were obtained from medical records. For the control group, cell count was performed using the Counter-Coulter T-890 equipment.

The mathematical calculation using hemogram parameters to determine the blood cell count indexes were performed using a Microsoft Excel® spreadsheet.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical data analysis was performed using SPSS® (version 19.0) and GraphPad Prism® (version 8.02) software. Data normality was tested by the Shapiro-Wilk test. Parametric data were presented as mean and standard deviation. For non-parametric data, median and interquartile ranges were presented. The comparison of continuous variable medians between groups was performed using the Kruskal-Wallis test. Multiple comparisons were performed using Dunn's post-test. For normal data, Turkey's test was applied after ANOVA. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

As causes of CKD in children and adolescents, glomerulopathies in all stages (I, II, III and IV) accounted for 38.45%, with 23.07% of patients in

early stages (I or II) and 15.38% in advanced stages (III or IV). The CAKUT group represented 48.06%, with 17.30% of patients in early stages (I or II) and 30.76% in advanced stages (III or IV). The other causes of CKD (tubulopathies, cystic diseases, among others) represented 13.46% of the cases, and all were in more advanced stages (III and IV). Clinical and laboratory data from CKD patients are shown in Tables 1 and 2, respectively.

Table 3 shows the indexes medians in the different groups of participants (IA, IB, IIA, IIB, III and V) and Table 4 shows the indexes in patients with CKD in stages 1 to 4 (group IV) and healthy controls (V).

The distribution of the median values of the indexes (NLR, dNLR, LMR, SIRI, AISI and SII) for the six groups (IA, IB, IIA, IIB, III and V) is shown in Figure 1.

A difference was found for NLR among the six groups ($P = 0.022$). We also performed comparisons between two groups at a time (group 1 vs. group 2, group 1 vs. group 3, and so on). However, no difference was observed between pairs of groups. There was no difference in dNLR among the six groups studied ($P = 0.099$). For LMR, a difference was observed when comparing the six groups ($P < 0.001$). In the comparisons between two groups at a time, the LMR was lower when comparing the IB versus V and IIB versus V groups ($P = 0.047$ and $P = 0.031$, respectively). For SIRI, the comparison revealed differences among the six groups ($P = 0.003$), with higher values in group III compared to group V ($P = 0.030$). For AISI, in the comparison among the six groups, a difference was observed ($P = 0.031$), but the pair-wise comparison did not show any difference. Finally, no difference was found when comparing the six groups for SII ($P = 0.258$). The distribution of NLR, dNLR, LMR, SIRI, AISI, and SII values for the group of patients with CKD and healthy controls (IV and V) is shown in Figure 2.

The LMR, SIRI and AISI indexes were significantly different in the CKD group (IV) and controls (V) ($P < 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.007$, respectively). Medians and interquartile ranges for LMR values were 6.00 (3.88) for group IV and 11.00 (4.50) for group V. The SIRI medians were 0.60 (0.73) and 0.20 (0.10) for groups IV and V, respectively. Similarly, the AISI medians were 167.50 (194.70) and 73.70 (53.55) for groups IV and V, respectively. There was no difference

TABLE 1 CLINICAL CHARACTERISTICS OF CHILDREN AND ADOLESCENTS PARTICIPATING IN THE STUDY

Parameters	Group IA (N = 12)	Group IB (N = 8)	Group IIA (N = 9)	Group IIB (N = 16)	Group III (N = 7)	Group IV (N = 52)	Group V (N = 33)
Age (years)^b	11.50 (4.0)	13.50 (5.0)	14.0 (5.0)	13.50 (5.0)	15.0 (8.0)	14.0 (5.0)	12.0 (5.0)
Gender^c							
Male [n(%)]	8 (67)	4 (50)	4 (44)	14 (88)	2 (29)	32 (62)	21 (54)
Female [N(%)]	4 (33)	4 (50)	5 (56)	2 (12)	5 (71)	20 (48)	12 (36)
Height^a	1.43 (0.12)	1.45 (0.26)	1.49 (0.15)	1.42 (0.26)	1.42 (0.29)	1.43 (0.21)	1.56 (0.16)
Weight^a	44.28 (16.12)	39.54 (15.23)	43.26 (15.08)	35.75 (17.49)	32.94 (14.31)	39.22 (15.99)	49.58 (16.45)
BMI (Kg/m²)^b	20.60 (7.50)	16.65 (8.78)	17.90 (9.10)	15.85 (3.47)	14.20 (3.60)	17.35 (5.65)	19.38 (3.49)
Blood pressure							
systolic^b	100 (18.0)	105 (19.0)	110 (17.0)	110 (25.0)	110 (26.0)	109 (16.25)	–
diastolic^b	60,0 (12.0)	70.0 (17.0)	70.0 (17.0)	70.0 (20.0)	65.0 (22.0)	70.0 (10.0)	
Hypotensive medication [N(%)]^c	3 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (29)	5 (10)	0 (0)
ACEI [N(%)]^c	8 (67)	4 (50)	4 (44)	10 (63)	4 (57)	30 (58)	0 (0)
Anemia treatment^c	0 (0)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	3 (43)	5 (10)	0 (0)

^aNormal Distribution: Variables presented as mean and standard deviation.

^bNon-normal distribution: Variables presented as median and interquartile range.

^cAbsolute and relative value.

–Data not available.

Parametric data are presented as mean ± standard deviation. Non-parametric data are presented as median and interquartile range (assessment by the Shapiro-Wilk normality test). BMI: body mass index; CKD: chronic kidney disease; ACE inhibitors: angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARA: Angiotensin receptor antagonists.

Group I: Glomerulopathies – All stages CKD (n = 20); **Subgroup IA:** Glomerulopathies – Stages 1 e 2 CKD (N = 12); **Subgroup IB:** Glomerulopathies – Stages 3 e 4 CKD (N = 8); **Group II:** CAKUT – All stages CKD (N = 25); **Subgroup IIA:** CAKUT – Stages 1 e 2 CKD (N = 9); **Subgroup IIB:** CAKUT – Stages 3 e 4 CKD (N = 16); **Group III:** Other – Stages 3 e 4 CKD (N = 7); **Group IV:** Stage 1 to 4 CKD (IA, IIA, IB, IIB, III) (N = 52); **Group V:** Controls (N = 33).

for NLR, dNLR, and SII (P = 0.104, P = 0.463, and P = 0.442 respectively).

DISCUSSION

In the present study, all CKD groups presented red blood cell parameters within the reference value, including groups in advanced stages (for ages between 1 and 6 years, the reference values for red blood cells, hemoglobin, and hematocrit are $4.5 \pm 0.6 \times 10^{12}/L$; 12.6 ± 1.5 g/dL; $37 \pm 3\%$; from 6 to 12 years, $4.5 \pm 0.6 \times 10^{12}/L$; 12.5 ± 1.5 g/dL; $40 \pm 3\%$; and over 12 years of age, $5.0 \pm 1.5 \times 10^{12}/L$; 14.0 ± 2 g/dL; $35 \pm 10\%$, respectively)¹⁹. It should be noted that 16% of patients at an advanced stage were being treated with recombinant erythropoietin (EPO) to prevent anemia. Likewise, the platelet count for all groups

was within the reference value (between 150 and $450 \times 10^3/mm^3$)¹⁹.

Regarding global leukocyte count, glomerulopathies and early-stage CAKUT groups and the control group (IA, IIA and V) showed normal values: 5.0 to $13.0 \times 10^9/L$ for children aged 2 to 12 years and 4.0 to $11.0 \times 10^9/L$ for children 12 or older. The differential leukocyte count revealed that the groups with CKD caused by glomerulopathies in advanced stages and other etiologies (IB and III) had neutrophilia, with values of 11.10 and $9.11 \times 10^3/mm^3$, respectively (reference value is 2 to $7 \times 10^3/mm^3$)¹⁹. Inflammation in chronic diseases is characterized by the predominance of vascular phenomena with increased permeability and increased number of neutrophils, which play their role in the inflammatory site through diapedesis²⁰. Through

TABLE 2 LABORATORY PARAMETERS OF CHILDREN AND ADOLESCENTS IN GROUPS IA, IB, IIA, IIB, III AND V

Parameters	Subgroup IA (N = 12)	Subgroup IB (N = 8)	Subgroup IIA (N = 9)	Subgroup IIB (N = 16)	Group III (N = 7)	Group V (N = 33)	p
Red blood cells (n° × 10 ⁶ /mm ³) ^a	4.59 (0.39)	4.41 (1.27)	4.39 (0.42)	4.39 (0.68)	4.02 (0.66)	4.75 (0.44)	0.095
Hemoglobin (g/dL) ^a	13.9 (1.24)	12.08 (2.32)	12.57 (0.99)	12.24 (1.22)	11.78 (1.76)	13.46 (1.17)	0.006
Hematocrit (%) ^a	39.01 (3.68)	35.83 (6.71)	37.77 (2.38)	37.34 (4.18)	35.90 (6.05)	39.99 (3.92)	0.069
Platelets (n° × 10 ³ /mm ³) ^b	314,50 (103,25)	269,00 (427,75)	241,00 (76,00)	244,00 (56,50)	258,00 (198,50)	282,00 (72,25)	0,146
Global de leukocytes (n° × 10 ³ /mm ³) ^b	5,97 (3,90)	13,40 (7,20)	6,04 (2,85)	2,80 (2,52)	12,54 (11,48)	5,70 (1,90)	0,257
Neutrophil (n° × 10 ³ /mm ³) ^b	2.40 (1.79)	11.10 (7.69)	3.59 (2.29)	2.70 (1.70)	9.11 (11.02)	2.81 (1.58)	0.094
Lymphocyte (n° × 10 ³ /mm ³) ^b	2.65 (1.29)	2.69 (2.51)	2.00 (1.21)	2.37 (2.10)	2.54 (1.14)	2.41 (0.78)	0.566
Monocyte (n° × 10 ³ /mm ³) ^b	0.60 (0.60)	0.60 (0.10)	0.3 (0.2)	0.35 (0.22)	0.45 (0.10)	0.20 (0.10)	0.002
Eosinophil (n° × 10 ³ /mm ³) ^b	0.24 (0.19)	0.46 (0.52)	0.32 (0.34)	0.29 (0.40)	0.33 (0.29)	0.14 (0.20)	0.235
GFR (mL/min/1.73m²) ^a	–	26.37 (15.79)	85.33 (23.91)	33.57 (14.64)	36.50 (11.50)	–	<0.001
Urea (mg/dL) ^a	–	83.25 (26.04)	40.50 (10.19)	102.8 (43.85)	90.0 (10.68)	–	<0.001
Creatinine (mg/dL) ^a	–	3.67 (1.71)	1.15 (0.37)	3.02 (1.18)	2.59 (0.95)	–	<0.001
Uric acid (mg/dL) ^a	–	5.82 (1.49)	6.87 (1.71)	7.11 (1.32)	6.17 (1.25)	–	<0.001
Sodium (mmol/L) ^a	–	141.00 (3.16)	140.83 (2.64)	142.10 (2.60)	139.00 (1.83)	–	0.282
Potassium (mmol/L) ^a	–	4.41 (1.04)	4.72 (0.34)	5.19 (0.60)	4.93 (0.59)	–	0.041
Chlorine (mmol/L) ^a	102.57 (1.90)	106.00 (5.65)	–	106.00 (1.41)	–	–	0.008
Phosphorus (mg/dL) ^b	5.10 (1.00)	5.25 (0.0)	–	5.40 (0.29)	–	–	0.644
Calcium (mg/dL) ^a	9.55 (0.43)	10.00 (0.56)	–	9.45 (0.21)	–	–	0.081
Magnesium (mg/dL) ^b	1.90 (0.50)	1.75 (0.0)	–	–	–	–	0.477
PTH (pg/mL) ^b	–	252.00 (418.13)	62.55 (43.53)	176.00 (188.30)	132.50 (17.00)	–	0.006
Total proteins (g/dL) ^a	6.56 (1.22)	–	–	7.73 (0.38)	–	–	0.154
Albumin (g/dL) ^a	4.17 (0.38)	4.15 (0.07)	–	3.85 (0.21)	–	–	0.484
Total cholesterol (mg/dL) ^b	–	161.00 102.00)	155.50 (35.00)	150.00 (75.00)	166.00 (38.00)	–	0.386
LDL (mg/dL) ^a	–	82.85 (12.82)	89.98 (13.07)	78.65 (9.98)	76.50 (38.89)	–	0.442
HDL (mg/dL) ^a	–	52.00 (15.66)	45.50 (11.02)	55.14 (26.55)	56.50 (0.71)	–	0.526
Triglycerides (mg/dL) ^b	–	95.00 (519.25)	80.50 (8750)	89.00 (105.00)	165.00 (80.00)	–	0.228

^aNormal Distribution: Variables presented as mean and standard deviation.

^bNon-normal distribution: Variables presented as median and interquartile range.

^cAbsolute and relative value.

–Data not available.

Parametric data are presented as mean ± standard deviation (assessment by ANOVA test). Non-parametric data are presented as median and interquartile range (assessment by the Kruskal wallis test).

Group I: Glomerulopathies – All stages CKD (n = 20); **Subgroup IA:** Glomerulopathies – Stages 1 e 2 CKD (N = 12); **Subgroup IB:** Glomerulopathies – Stages 3 e 4 CKD (N = 8); **Group II:** CAKUT – All stages CKD (N = 25); **Subgroup IIA:** CAKUT – Stages 1 e 2 CKD (N = 9); **Subgroup IIB:** CAKUT – Stages 3 e 4 CKD (N = 16); **Group III:** Other – Stages 3 e 4 CKD (N = 7); **Group IV:** Stage 1 to 4 CKD (IA, IIA, IB, IIB, III) (N = 52); **Group V:** Controls (N = 33).

TABLE 3 BLOOD COUNT DERIVED INDEXES OF THE EVALUATED GROUPS

Groups Indexes	Group IA (N = 12)	Group IB (N = 8)	Group IIA (N = 9)	Group IIB (N = 16)	Group III (N = 7)	Group V (N = 33)	P
NLR	1.0 (0.79)	2.43 (10.17)	1.30 (1.27)	1.28 (0.81)	2.84 (2.27)	1.13 (0.64)	0.022*
dNLR	0.70 (0.60)	1.90 (5.28)	0.90 (0.85)	0.90 (0.53)	1.85 (0.25)	0.90 (0.45)	0.099*
LMR	3.70 (3.60)	4.60 (5.10) ^a	6.10 (11.25)	6.70 (2.95) ^b	5.30 (3.97)	11.00 (4.50) ^{ab}	P < 0.001*
SIRI	0.90 (0.80)	1.65 (6.25)	0.30 (0.60)	0.50 (0.52)	0.25 (1.0) ^c	0.20 (0.10) ^c	0.003*
AISI	241.40 (-)	484.50 (1207.43)	67.70 (142.75)	120.10 (128.05)	236.55 (515.47)	73.30 (53.55)	0.031*
SII	308.30 (-)	721.45 (1943.50)	475.60 (349.85)	344.70 (238.05)	552.50 (1461.20)	310.40 (215.15)	0.258*

*p < 0.05 (comparison by Kruskal Wallis).

^aDunn post-test p = 0.047.

^bDunn post-test p = 0.031.

^cDunn post-test p = 0.030.

Non-parametric data are presented as median (interquartile range).

Group IA: Glomerulopathies – CKD stages 1 and 2 (N = 12); Group IB: Glomerulopathies – CKD stages 3 and 4 (N = 8); Group IIA: CAKUT – CKD stages 1 and 2 (N = 9); Group IIB: CAKUT – CKD stages 3 and 4 (N = 16); Group III: Other etiologies – CKD stages 3 and 4 (N = 7); Group V: Control (N = 33). NLR: Neutrophil-Lymphocyte Ratio; dNLR: Neutrophil-Lymphocyte-derived ratio; LMR: Lymphocyte-Monocyte Ratio; SIRI: Systemic Inflammation Response Index; AISI: Aggregate Index of Systemic Inflammation or Aggregate Index of Systemic Inflammation; SII: Systemic Immune-Inflammation Index or Index of Systemic Immune-Inflammation.

TABLE 4 BLOOD COUNT DERIVED INDEXES OF PEDIATRIC PATIENTS WITH CKD AND CONTROL GROUP

Groups Indexes	Group IV (N = 52)	Group V (N = 33)	P
NLR	1.43 (1.10)	1.13 (0.64)	0.104*
dNLR	1.05 (0.83)	0.90 (0.45)	0.463*
LMR	6.00 (3.88)	11.00 (4.50)	P < 0.001*
SIRI	0.60 (0.73)	0.20 (0.10)	0.001*
AISI	167.50 (194.70)	73.30 (53.55)	0.007*
SII	353.60 (301.35)	310.40 (215.15)	0.442*

*p < 0.05 (Mann-Whitney comparison).

Non-parametric data are presented as median (interquartile range).

Group IV: CKD group stage 1 to 4 (N = 52); Group V: Control (N = 33). NLR: Neutrophil/lymphocyte ratio; dNLR: Derived Neutrophil-Lymphocyte Ratio; LMR: Lymphocyte-Monocyte Ratio; SIRI: Systemic Inflammation Response Index; AISI: Aggregate Index of Systemic Inflammation or Aggregate Index of Systemic Inflammation; SII: Systemic Immune-Inflammation Index or Index of Systemic Immune-Inflammation.

this process, cells migrate from the bloodstream to the site of inflammation where they are required to act in an inflammatory/regenerative response^{9,21}.

Monocytes are highly reactive cells in the inflammatory processes. In tissues, they act on either M1 or M2 immune responses, and depending on the stimulus they can exacerbate or attenuate inflammation¹⁶. The median values for monocyte count of each group remained within the reference values, from 0.2 to 1.0 × 10³/mm³²², as for lymphocytes

and eosinophils, from 1.0 to 3.0 × 10³/mm³ and from 0.02 to 0.5 × 10³/mm³, respectively²².

Usually, the kidney function status is assessed by markers such as GFR, creatinine, urea, and uric acid. Changes in these parameters are suggestive of impaired kidney function^{3,18}.

GFR is useful to classify CKD, and differences in GFR were observed among the evaluated groups. All CKD groups had GFR averages lower than the reference values, which allowed stage classification of

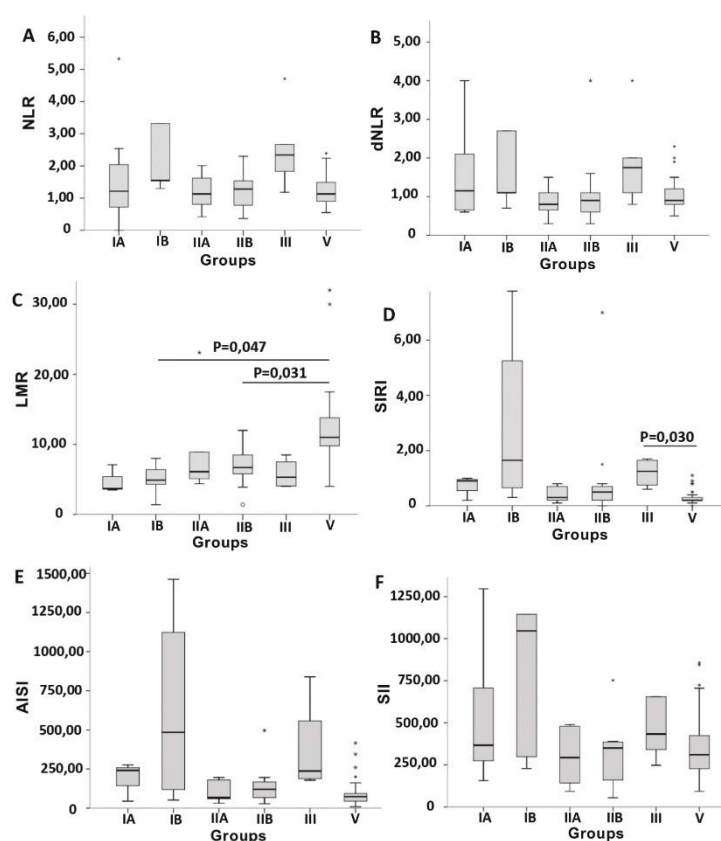


Figure 1. A) NLR values in the groups; B) dNLR values in the groups; C) LMR values in the groups; D) SIRI values in groups; E) AISI values in groups; F) SII values in groups. Group IA: Glomerulopathies – CKD stages 1 and 2 (N = 12); Group IB: Glomerulopathies – CKD stages 3 and 4 (N = 8); Group IIA: CAKUT – CKD stages 1 and 2 (N = 9); Group IIB: CAKUT – CKD stages 3 and 4 (N = 16); Group III: Other etiologies – CKD stages 3 and 4 (N = 7); Group V: Control (N = 33). NLR: Neutrophil-Lymphocyte Ratio; dNLR: Neutrophil-lymphocyte-derived ratio; LMR: Lymphocyte-Monocyte Ratio; SIRI: Systemic Inflammation Response Index; AISI: Aggregate Index of Systemic Inflammation or Aggregate Index of Systemic Inflammation; SII: Systemic Immune-Inflammation Index or Index of Systemic Immune-Inflammation.

the studied CKD patients. Groups in advanced stages of CKD (IB, IIB and III) had lower GFR, corroborating the findings in the literature^{3,18,23,24}.

All CKD groups had serum urea levels higher than the reference values (8 to 36 mg/dL)²⁵, and those with advanced stage CKD presented the highest levels. Serum creatinine levels were also high in all CKD groups, and groups in advanced stages (IB, IIB and III) showed even higher levels.

It is known that uric acid accumulates in the blood in CKD, raising its circulating levels^{25,26}. In agreement with the literature, values above the reference values (0.5 to 6mg/dL) were obtained for the CAKUT and other etiologies groups.

The regulation of the hydroelectrolytic balance results from the gain and loss of electrolytes/water ratio. If sodium (Na⁺) intake is high, its reabsorption by the kidney tubules is reduced and, consequently, a higher volume of urine is produced. Chlorine (Cl⁻) also participates in this process, but a smaller amount of chlorine is eliminated. Other ions, such as potassium (K⁺), Ca²⁺, and phosphate (PO₄³⁻) have a role in this process. However, kidney injuries result in changes in the function of the kidney tubules, compromising the hydroelectrolytic balance^{27,28}. All CKD groups presented Na⁺ and K⁺ levels within the reference values (132 to 145 mEq/L and 3.5 to 5.1 mEq/L, respectively)²⁵. This

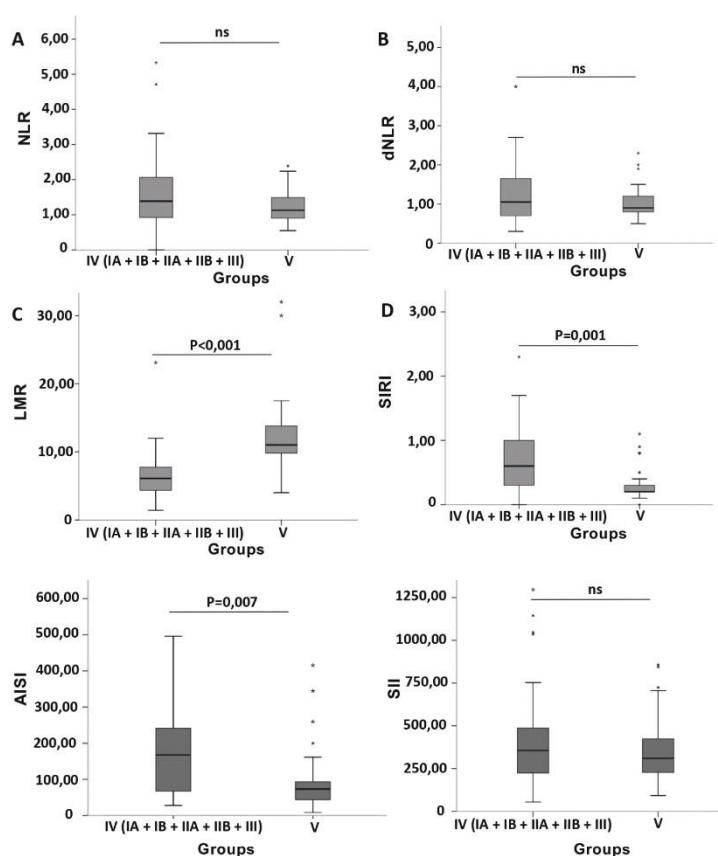


Figure 2. A) NLR values in the groups; B) dNLR values in the groups; C) LMR values in the groups; D) SIRI values in groups; E) AISI values in groups; F) SII values in groups. Group IV: (IA, IB, IIA, IIB, III) CKD Group (N = 52); Group V: Control (N = 33). NLR: Neutrophil-Lymphocyte Ratio; dNLR: Neutrophil-lymphocyte-derived ratio; LMR: Lymphocyte-Monocyte Ratio; SIRI: Systemic Inflammation Response Index; AISI: Aggregate Index of Systemic Inflammation or Aggregate Index of Systemic Inflammation; SII: Systemic Immune-Inflammation Index or Index of Systemic Immune-Inflammation.

is probably because CKD patients from the second stage onwards make periodic determinations of these ions, and intervention measures are promptly adopted when alterations are detected to restore the hydroelectrolytic balance^{18,36}. For all evaluated groups, the mean chlorine levels were within the reference range (97 to 106 mEq/L)²⁵.

It is known that the balance of calcium levels is controlled by the action of parathyroid hormone (PTH), produced by the parathyroid glands. In cases of calcium loss or reduction, PTH acts at the kidney level, promoting Ca^{2+} reabsorption and stimulating its release from the bone tissue. PTH also acts on the kidneys by reducing the reabsorption of PO_4^{3-} ^{27,28}.

All CKD patients had calcium levels within the reference values (8.8 to 10.8 mg/dL)²⁵, since they are monitored and treated when necessary^{19,36}. However, PTH levels were very high compared to reference values (18.5 to 88.0 pg/mL), especially in groups of advanced CKD stages. This is because kidney diseases cause an alteration in calcium levels due to its loss in the urine, which results in a greater release of PTH, increasing calcium circulation levels as an attempt to avoid the loss of calcium²⁹.

It is known that in CKD, especially when caused by glomerulopathies, there is a change in the lipid profile due to kidney losses and consequent stimulation of the hepatic production of lipoproteins²⁸. Nonetheless,

all studied groups had medians of total cholesterol within reference values (<170 mg/dL)²⁵.

BLOOD CELL COUNT INDEXES

All advanced stages CKD groups had higher NLR values compared to the control group (V). This demonstrates that progression of CKD with deterioration of kidney function is associated with inflammation^{11,14}. However, there was no difference when comparing the groups of patients with CKD (all etiologies in stages 1 to 4) (IV) to the control group (V). For dNLR and SII, there was no difference when comparing the groups with CKD among themselves or in relation to the controls.

LMR had a lower value in CKD patients compared to the control group, which suggests a higher degree of inflammation in the CKD patients. For patients with advanced stage glomerulopathies (IB) and advanced stage CAKUT (IIB), the LMR showed significantly lower values compared to the control group (V), suggesting that the higher inflammatory level, the greater the progression of CKD^{30,31,35,37}. The LMR was lower in the groups with early and advanced stage glomerulopathies (IA and IB). It is known that in glomerulopathies, the harmful inflammatory process affects the glomerular endothelial cells and, therefore, LMR may be associated with endothelial dysfunctions¹⁶.

Regarding SIRI, all groups (early and advanced stages glomerulopathies, early and advanced stages CAKUT and other etiologies CKD) had values higher than the control group (V). However, the difference was observed only between CKD patients with other etiologies at an advanced stage (III) and the control group (V). When comparing the group of patients with CKD (IV) to the control group (V), SIRI was significantly increased in the CKD group IV. It is known that the greater the progression of CKD and deterioration of kidney function, the greater the parenchymal inflammatory process^{32,33,37}. This index reveals a relationship between neutrophils, lymphocytes, and monocytes and allows evaluating the inflammatory action. It is known that neutrophils are able to promote inflammation in the microenvironment (renal parenchyma) and inhibits lymphocyte activity with suppression of the regulatory response of T cells and activation of macrophage cells. Thus, with a higher numerator (neutrophils and monocytes) and a lower denominator (lymphocytes), the SIRI score increases, reflecting the inflammatory status^{13,17}.

AISI had a trend for higher values in advanced stages of CKD (IB and IIB) compared to early stages in each etiology. As an inflammation marker, AISI is associated with death. Higher AISI values indicate reduced survival probability in patients with COVID-19 and idiopathic pulmonary fibrosis, and in the latter, it is possible to determine the severity and stage of the disease³⁴, even if no difference was found when comparing two groups at a time. Therefore, it is possible to observe the difference by comparing CKD and control groups, revealing the inflammatory state. However, AISI determination was not considered as an inflammation marker in patients with CKD, both in children and adults.

CONCLUSION

Multiple factors play a role in CKD, such as genetics, lifestyle, age, immunological condition, oxidative stress, uremic status, and infections, which characterizes it as a multifactorial and heterogeneous disease. The inflammatory response in the renal parenchyma is complex and with dualities, depending on intrinsic factors of each patient.

Thus, in the pediatric age, this complexity is added to other peculiarities, like child growth, endocrine profile, environmental and social adaptation, emotional and organic stresses, as well as inflammatory responses. The data obtained in this pioneering study, involving Brazilian children and adolescents with CKD, allow us to infer that blood cell count-derived indexes, such as LMR and SIRI, are promising for determining the inflammatory status of CKD children and adolescents according to etiology and stage.

ACKNOWLEDGMENTS

We'd like to thank all participants of this study.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AJS, PNA, and LMSD had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity and the accuracy of data analysis. PNA and LMSD also conceived and designed the experiments. AJS, PNA and APLM performed the experiments and analyzed the data. ACSS participated in the screening and selection of patients for this study. AJS, PNA and ACSL wrote the paper.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The following online material is available for this article:

Table s1 - Classification of stages of Chronic Kidney Disease.

Table s2 - Inclusion and exclusion criteria for children with CKD.

Table s3 - Inclusion and exclusion criteria for control group.

REFERENCES

- Lee SA, Noel S, Sadasivam M, Hamad AR, Rabb H. Role of immune cells in acute kidney injury and repair. *Nephron Clin Pract.* 2017;137(4):282–6. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000477181>. PubMed PMID: 28601878.
- Marinho AW, Penha AP, Silva MT, Galvão TF. Prevalence of chronic renal disease among Brazilian adults: a systematic review. *Cad Saude Colet.* 2017;25(3):379–88. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-462x201700030134>
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 13;3(1):1–135. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/kisup.2012.76>
- Kaspar CD, Bholah R, Bunchman TE. A review of pediatric chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2016;41(1-3):211–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000441737>. PubMed PMID: 26766175.
- Ingelfinger JR, Kalantar-Zadeh K, Schaefer F, World Kidney Day Steering Committee. In time: averting the legacy of kidney disease – focus on childhood. *Rev Paul Pediatr.* 2016;34(1):5–10. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpped.2015.05.008>. PubMed PMID: 26846738.
- Belangero VM, Prates LC, Watanabe A, Schwartsman BS, Nussenzweig P, Cruz NA, et al. Prospective cohort analyzing risk factors for chronic kidney disease progression in children. *J Pediatr (Rio J).* 2018;94(5):525–31. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2017.07.015>. PubMed PMID: 28982638.
- Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2017. *J Bras Nefrol.* 2019;41(2):208–14. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-2018-0178>. PubMed PMID: 30968930.
- Vianna HR, Soares BM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva AC. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. *Brazilian Journal of Nephrology.* 2011;33(3):351–64. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002011000300012>. PubMed PMID: 22042353.
- Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2015;39(1-3):84–92. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000368940>. PubMed PMID: 25662331.
- Su H, Lei CT, Zhang C. Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update. *Front Immunol.* 2017;8:405. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00405>. PubMed PMID: 28484449.
- Liu Y, Du X, Chen J, Jin Y, Peng L, Wang H, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect.* 2020;81(1):6–12. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.002>. PubMed PMID: 32283162.
- Goto W, Kashiwagi S, Asano Y, Takada K, Takahashi K, Hatano T, et al. Predictive value of lymphocyte-to-monocyte ratio in the preoperative setting for progression of patients with breast cancer. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1137. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-018-5051-9>. PubMed PMID: 30453914.
- He Q, Li L, Ren Q. The Prognostic value of preoperative systemic inflammation response index (SIRI) in patients with High-grade glioma and the establishment of a nomogram. *Front Oncol.* 2021;11:1–15.
- Rios DR, Pinheiro MB, Oliveira Jr WV, Gomes KB, Carvalho AT, Martins-Filho OA, et al. Cytokine signature in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Dis Markers.* 2017;2017:9678391. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/9678391>. PubMed PMID: 28819334.
- Eskiizmir G, Uz U, Onur E, Ozyurt B, Cikrikci GK, Sahin N, et al. The evaluation of pretreatment neutrophil-lymphocyte ratio and derived neutrophil-lymphocyte ratio in patients with laryngeal neoplasms. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed).* 2019;85(5):578–87. PubMed PMID: 29936214.
- Balta S, Demirer Z, Aparci M, Yildirim AO, Ozturk C. The lymphocyte-monocyte ratio in clinical practice. *J Clin Pathol.* 2016;69(1):88–9. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/clinpath-2015-203233>. PubMed PMID: 26307075.
- Zheng Y, Chen Y, Chen J, Chen W, Pan Y, Bao L, et al. Combination of systemic inflammation response index and platelet-to-lymphocyte ratio as a novel prognostic marker of upper tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy. *Front Oncol.* 2019;9:914. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00914>. PubMed PMID: 31620369.
- Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease. *Kidney Int.* 2005;67(6):2089–100. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00365.x>. PubMed PMID: 15882252.
- Bain BJ, Bates I, Laffan MA. *Practical haematology.* 12th ed. USA: Elsevier; 2017.
- Gavins FN, Hickey MJ. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. *Front Immunol.* 2012;3(3):1–11. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00354>. PubMed PMID: 23230437.
- Norlander AE, Saleh MA, Madhur MS. CXCL16: a chemokine causing chronic kidney disease. *Hypertension.* 2014;62(6):1008–10. doi: <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01954>. PubMed PMID: 24060889.
- Zinellu A, Collu C, Nasser M, Paliogiannis P, Mellino S, Zinelli E, et al. The Aggregate Index of Systemic Inflammation (AISI): a novel prognostic biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Med.* 2021;10(18):1–11.
- Kirsztajn GM, Salgado Fo N, Draibe SN, Netto MV, Thomé FS, Souza E, et al. Fast Reading of the KDIGO 2012: guidelines for evaluation and management of chronic kidney disease in clinical practice. *J Bras Nefrol.* 2014;36(1):63–73. doi: <http://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20140012>. PubMed PMID: 24676617.
- Krane V, Wanner C. Statins, inflammation and kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(7):385–97. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2011.62>. PubMed PMID: 21629228.
- Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, O'Reilly DS. *Clinical biochemistry.* 5th ed. USA: Elsevier; 2015.
- Bastos MG, Kirsztajn GM. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. *Brazilian Journal of Nephrology.* 2011;33(1):93–108. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002011000100013>. PubMed PMID: 21541469.
- Hall JE, Guyton AC. *Medical physiology.* 14th ed. USA: Elsevier; 2020.
- Rennke HG, Denker BM. *Renal pathophysiology: the essentials.* 4th ed. USA: Wolters Kluwer business; 2009.
- Becherucci F, Roperto RM, Materassi M, Romagnani P. Chronic kidney disease in children. *Clin Kidney J.* 2016;9(4):583–91. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/ckj/sfw047>. PubMed PMID: 27478602.
- Guzzi F, Cirillo L, Roperto RM, Romagnani P, Lazzeri E. Molecular mechanisms of the acute kidney injury to chronic kidney disease transition: an updated view. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):1–15. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20194941>. PubMed PMID: 31590461.

31. Kimmel PL, Rosenberg ME. Inflammation in Chronic Kidney Disease. In: Elsevier Science 2nd ed. Chronic Renal Disease. Washington: Elsevier; 2020. p. 199–212. Chapter 4 - Pathophysiology
32. Gungor O, Unal HU, Guclu A, Gezer M, Eylleten T, Guzel FB, et al. IL-33 and ST2 levels in chronic kidney disease: associations with inflammation, vascular abnormalities, cardiovascular events, and survival. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178939. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0178939>. PubMed PMID: 28614418.
33. Chen WY, Li LC, Yang JL. Emerging roles of IL-33/ST2 axis in renal diseases. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):1–15. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18040783>. PubMed PMID: 28387719.
34. Hamad AI, Aly MM, Abdelhameid MA, Ahmed SA, Shalrout AS, Abdel-Moniem AE, et al. Combined blood indexes of systemic inflammation as a mirror to admission to intensive Care Unit in COVID-19 patients: a multicentric study. *J Epidemiol Glob Health*. 2021;12(1):64–73. PubMed PMID: 34904189.
35. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Oliveira GR, Canhestro MR, Colosimo EA, et al. Predictive factors of progression to chronic kidney disease stage 5 in a predialysis interdisciplinary programme. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(3):848–55. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfn547>. PubMed PMID: 18840891.
36. Park KS, Hwang YJ, Cho MK, Ko CW, Ha S, Kang HG, et al. Quality of life in children with end-stage renal disease based on a PedsQL ESRD module. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(12):2293–300. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-012-2262-1>. PubMed PMID: 22832667.
37. Nogueira PC, Paz IP. Signs and symptoms of developmental abnormalities of the genitourinary tract. *J Pediatr (Rio J)*. 2016;92(3, Suppl 1):S57–63. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2016.01.006>. PubMed PMID: 26994452.
38. Chevalier RL, Thornhill BA, Forbes MS, Kiley SC. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(4):687–97. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-009-1316-5>. PubMed PMID: 19844747.
39. Nogueira PC, Feltran LS, Camargo MF, Leão ER, Benninghover JR, Gonçalves NZ, et al. Estimated prevalence of childhood end-stage renal disease in the state of São Paulo. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2011;57(4):436–41. PubMed PMID: 21876928.
40. Martelli A. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure Blood Pressure. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(10):602–9. PubMed PMID: 22926246.

REVISÃO SISTEMÁTICA EM ANDAMENTO

A aluna está participando do desenvolvimento de uma segunda revisão sistemática, que tem como objetivo avaliar se os níveis de trombomodulina durante a gestação estão associados à ocorrência de pré-eclâmpsia. Este estudo está registrado no PROSPERO sob o número CRD42023456919 e, no presente momento, está na fase de análise dos dados e redação do artigo para publicação. A perspectiva é de que esta revisão sistemática seja submetida para publicação ainda no ano de 2024.

ATIVIDADES REALIZADAS

As seguintes atividades foram realizadas durante o doutorado:

1. Cinco artigos publicados;
2. Um artigo submetido;
3. Três aulas ministradas no PPGACT em 2020, 2021 e 2022;
4. Curso: Revisão Sistemática e Meta-análise, oferecido pela Universidade Estadual de Campinas;
5. Curso: Introduction to Systematic Review and Meta-Analysis, oferecido pela Johns Hopkins University;
6. Participação em eventos científicos;
7. Participação em banca de TCC.
8. Duas coorientações de TCC;
9. Participação em projeto de extensão;
10. Cumprimento dos créditos;
11. Realização do estágio obrigatório;
12. Palestras na disciplina de Seminários, coordenada pelo Prof. Vicente;

Artigos publicados

› *Mol Cell Probes*. 2019 Jun;45:43-47. doi: 10.1016/j.mcp.2019.04.004. Epub 2019 Apr 24.

Association among ACE, ESR1 polymorphisms and preeclampsia in Brazilian pregnant women

Ana Cristina Dos Santos Lopes ¹, Luiza Oliveira Perucci ², Fernanda Cristina Gontijo Evangelista ¹, Lara Carvalho Godoi ¹, Adriano de Paula Sabino ¹, Karina Braga Gomes ¹, André Talvani ³, Luci Maria S Dusse ⁴, Patrícia Nessralla Alpoim ¹

Affiliations + expand

PMID: 31028794 DOI: 10.1016/j.mcp.2019.04.004

› *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2021 Mar;43(3):232-234. doi: 10.1055/s-0041-1728661. Epub 2021 Apr 15.

Are Endocan Plasma Levels Altered in Preeclampsia?

Ana Cristina Dos Santos Lopes ¹, Suellen Rodrigues Martins ¹, Luci Maria SantAna Dusse ¹, Melina de Barros Pinheiro ², Patrícia Nessralla Alpoim ¹

Affiliations + expand

PMID: 33860506 DOI: 10.1055/s-0041-1728661

Free article

› *Can J Physiol Pharmacol*. 2022 Sep 1;100(9):926-936. doi: 10.1139/cjpp-2021-0714.

Epub 2022 May 25.

Hemostasis and oxidative stress in chronic kidney disease in children and adolescents

Ana Cristina Dos Santos Lopes ¹, Letícia Parreiras Nunes Sousa ¹, Rívia Mara Moraes E Silva ¹, Ana Cristina Simões E Silva ², Luci Maria SantAna Dusse ¹, Patrícia Nessralla Alpoim ¹

Affiliations + expand

PMID: 35613472 DOI: 10.1139/cjpp-2021-0714

> [J Bras Nefrol. 2023 Oct-Dec;45\(4\):458-469. doi: 10.1590/2175-8239-JBN-2022-0190en.](#)

Pediatric chronic kidney disease: blood cell count indexes as inflammation markers

[Article in English, Portuguese]

Aislander Junio da Silva ¹, Ana Cristina Dos Santos Lopes ¹, Ana Paula Lucas Mota ¹, Ana Cristina Simões E Silva ², Luci Maria Sant'Ana Dusse ¹, Patrícia Nessler Alpoim ¹

Affiliations + expand









PMID: 37948452 PMCID: PMC10726671 DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2022-0190en

[Free PMC article](#)

Early and late-onset preeclampsia: effects of DDAH2 polymorphisms on ADMA levels and association with DDAH2 haplotypes

Rev Bras Ginecol Obstet. 2024;46()

DOI: [10.61622/rbgo/2024AO19](#)




Fernanda Santos Mendes , Marcelo Rizzatti Luizon , Ana Cristina dos Santos Lopes , Daniela Alves Pereira , Fernanda Cristina Gontijo Evangelista , Lara Carvalho Godoi , Luci Maria Dusse , Patrícia Nessler Alpoim 

Artigo submetido

Manuscripts I Have Co-Authored

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
✉ Contact Journal ADM: Office, Journal <ul style="list-style-type: none"> Awaiting Admin Processing 	13988.R1	CHANGES IN MICRORNA EXPRESSION ASSOCIATED WITH PREECLAMPSIA: A Systematic Review View Submission Submitting Author: Alpoim, Patricia	22-Jul-2024	02-Sep-2024
✉ Contact Journal ADM: Office, Journal <ul style="list-style-type: none"> Major Revision (24-Jun-2024) a revision has been submitted 	13988	CHANGES IN MICRORNA EXPRESSION ASSOCIATED WITH PREECLAMPSIA: A Systematic Review View Submission Submitting Author: Alpoim, Patricia	12-Mar-2024	13-Mar-2024

Aulas ministradas no PPGACT






UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



CERTIFICADO

Certificamos que a Mestra **ANA CRISTINA DOS SANTOS LOPES** ministrou aula na disciplina **Tópicos Especiais em Análises Clínicas e Toxicológicas II: Gestação, pré-eclâmpsia e outras complicações: multidisciplinaridade no acompanhamento e monitoração laboratorial do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, sobre o tema "Exames Laboratoriais no pré-natal", no dia 10/03/2020 das 15:00 às 16:30 h, totalizando 1 hora e 30 minutos.**


Belo Horizonte, 10 de março de 2020.


Prof. Dr. André Luís Branco de Barros
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - BH/MG - CEP 31270-901 - Faculdade de Farmácia - sala 1023 B2
Tel. (31) 3409-6847- Fax (31) 3409-6852 - E-mail: ppgact@farmacia.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

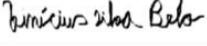



CERTIFICADO

Certificamos que a Mestra **ANA CRISTINA DOS SANTOS LOPES** ministrou aula na disciplina "Gestação, pré-eclâmpsia e outras complicações: multidisciplinaridade no acompanhamento e monitoração laboratorial" dos Programas de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, Ciências Farmacêuticas da UFSJ e Ciências da Saúde da UFSJ, sobre os temas "Exames Laboratoriais no pré-natal", no dia 31/05/2021 das 15:30 às 16:30h, totalizando 1 hora.


Prof. Dr. André Luís Branco de Barros
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG


Prof. Dr. Rene Oliveira do Couto
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSJ/CCO

23 de julho de 2021.

Prof. Dr. Vinícius Silva Belo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFSJ/CCO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

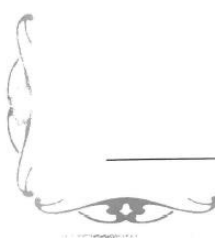
CERTIFICADO

Certificamos que ANA CRISTINA DOS SANTOS LOPES ministrou aula na disciplina ACT842 - TÓPICOS ESPECIAIS II: GESTAÇÃO, PRÉ-ECLÂMPسيا E OUTRAS COMPLICAÇÕES: MULTIDISCIPLINARIDADE NO ACOMPANHAMENTO E MONITORAÇÃO LABORATORIAL do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, sobre o tema "Exames Laboratoriais no pré-natal", no dia 29/08/2022, perfazendo um total de 1 hora/aula.

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2022.




Prof. Dra. Adriana Oliveira Costa


Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas
e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG











PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - BH/MG - CEP 31270-901 - Faculdade de Farmácia - sala 1023 B2
Tel. (31) 3409-6847- Fax (31) 3409-6852 - E-mail: ppgact@farmacia.ufmg.br

Curso: Revisão Sistemática e Meta-análise, oferecido pela Universidade Estadual de Campinas

pesquisar no curso Pesquisar   Ana Cristina dos Sant... ▾

 Você foi aprovado no curso! Sua nota é 98.57%.

Item	Situação	Vencimento	Peso	Nota
 Introdução à revisão sistemática Teste	Aprovado	Sep 21 3:59 AM -03	6,25%	100%
 Pergunta de pesquisa Teste	Aprovado	Sep 21 3:59 AM -03	6,25%	97,97%
 Variações da pergunta Teste	Aprovado	Sep 21 3:59 AM -03	6,25%	100%
 Planejamento e protocolo de revisão Teste	Aprovado	Sep 28 3:59 AM -03	6,25%	100%
 Busca na literatura Teste	Aprovado	Sep 28 3:59 AM -03	6,25%	100%
 Seleção dos estudos Teste	Aprovado	Sep 28 3:59 AM -03	6,25%	100%
 Extração dos dados Teste	Aprovado	Oct 5 3:59 AM -03	6,25%	96,66%



✓	Risco de viés em estudos primários Teste	Aprovado	Oct 5 3:59 AM -03	6,25%	97,50%	
✓	Risco de viés de estudos secundários Teste	Aprovado	Oct 5 3:59 AM -03	6,25%	100%	
✓	Sumarização dos resultados Teste	Aprovado	Oct 12 3:59 AM -03	6,25%	92,30%	
✓	Meta-análise Teste	Aprovado	Oct 12 3:59 AM -03	6,25%	100%	
✓	Heterogeneidade e viés de publicação Teste	Aprovado	Oct 12 3:59 AM -03	6,25%	100%	
✓	Qualidade da evidência gerada Teste	Aprovado	Oct 19 3:59 AM -03	6,25%	100%	
✓	Fatores que afetam a confiança na evidência Teste	Aprovado	Oct 19 3:59 AM -03	6,25%	100%	
✓	Conclusão da revisão Teste	Aprovado	Oct 26 3:59 AM -03	6,25%	96,96%	
✓	Redação e publicação da revisão Teste	Aprovado	Oct 26 3:59 AM -03	6,25%	95,83%	?















Tarefas com créditos

Opcional — complete para obter reconhecimento de conclusão com mérito para este curso.

✓	Tempo e recursos para elaborar revisões sistemáticas Teste com mérito	Aprovado	Sep 21 3:59 AM -03	--	100%	
✓	Iniciar uma revisão sistemática Teste com mérito	Aprovado	Sep 28 3:59 AM -03	--	100%	
✓	Ciência aberta e disseminação científica Teste com mérito	Aprovado	Oct 12 3:59 AM -03	--	100%	
✓	Sínteses de revisões sistemáticas Teste com mérito	Aprovado	Oct 19 3:59 AM -03	--	100%	



Curso: Introduction to Systematic Review and Meta-Analysis, oferecido pela Johns Hopkins University

Item	Situação	Vencimento	Peso	Nota
 Você foi aprovado no curso! Sua nota é 87.84%.				
 Module 2 Teste	Aprovado	Jan 18 5:59 AM -02	9%	80%
 Peer Assessment 1 Envie sua tarefa e revise 3 tarefas do colega para obter sua nota.			15%	90%
 Envie sua tarefa	Aprovado	Jan 18 5:59 AM -02		
 Revisar 3 tarefas do colega.	3/3 reviewed	Jan 21 5:59 AM -02		
 Module 3 Teste	Aprovado	Jan 25 5:59 AM -02	9%	100%
 Module 4 Teste	Aprovado	Jan 25 5:59 AM -02	9%	80%
 Module 5 Teste	Aprovado	Feb 1 5:59 AM -02	9%	100%
 Module 6 Teste	Aprovado	Feb 1 5:59 AM -02	9%	100%
 Module 7 Teste	Aprovado	Feb 8 5:59 AM -02	9%	80%
 Module 8 Teste	Aprovado	Feb 8 5:59 AM -02	9%	80%
 Peer Review Assignment 2 Envie sua tarefa e revise 3 tarefas do colega para obter sua nota.			22%	84,31%
 Envie sua tarefa	Aprovado	Feb 15 5:59 AM -02		
 Revisar 3 tarefas do colega.	5/3 reviewed	Feb 18 5:59 AM -02		

Participação em eventos científicos

S12

Abstracts/Thrombosis Research 175, Suppl. 1 (2019) S1–S23

Table 1 (abstract P016). Routine laboratory data of the pregnant woman with HELLP syndrome

Parameter	Mar/27/18	Apr/26/18	May/19/18 Day of delivery	May/21/18	May/24/18	Aug/07/18	Sep/27/18
RBC ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	3.86	–	3.60	3.35	–	–	4.21
Hb (g/dL)	12.2	–	11.9	10.76	10.41	–	12.47
Hct (%)	34.5	–	33.4	29.98	29.02	–	36.44
MCV (fL)	89.4	–	–	80	–	–	87
RDW (%)	13.3	–	11.38	12.12	–	–	10.93
Leukocytes ($/\text{mm}^3$)	7.18	–	12.70	12.92	10.720	–	6.2
Neutrophils (%)	77.2	–	86.9	78.4	–	–	61
Lymphocytes (%)	14.8	–	5.9	12.6	–	–	28.5
Platelets ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	254	–	45.92	70.21	133.6	–	238.5
MPV	–	–	7.9	9.7	–	–	6.4
AST (U/L)	–	–	365	82	84	23	–
ALT (U/L)	–	–	384	216	149	27	–
Total bilirubin (mg/dL)	–	–	0.74	–	0.3	0.3	–
Conjugated	–	–	0.33	–	0.1	0.1	–
Unconjugated	–	–	0.61	–	0.2	0.2	–
LDH (U/L)	–	–	1094	711	647	–	–
Glycemia (mg/dL)	67	–	–	–	–	–	–
Uric acid (mg/dL)	–	–	6	–	5	–	–
Urea (mg/dL)	–	27	–	22	–	–	–
Creatinine (mg/dL)	–	0.62	0.8	0.7	0.7	–	–

RBC, red blood cells; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; RDW, red cell distribution width; MPV, mean platelet volume; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase.

plethora of chemokines, cytokines and growth factors. The fold-change increase in comparison to the mean levels of healthy pregnant ranged from 1.5 times for TNF to 22 times for IL-13 (mean = 6 times when considering all biomarkers).

Conclusions: A systemic overproduction of soluble mediators bring about novel insights to better understand the pathophysiology of this severe illness and arise as a complication of immunological profile associated with the microvascular endothelial activation and cell injury observed in HELLP syndrome.

Support: CNPq (404353/2016-9) and FAPEMIG/BRAZIL (PPM-00764-16)

P017

Are the polymorphisms in ACE and ESR1 genes associated with preeclampsia occurrence?

A.C.S. Lopes¹, L.O. Perucci², F.C.G. Evangelista¹, L.C. Godoi³, A.P. Sabino¹, A. Tavani¹, L.M.S. Dusse¹, P.N. Alpoim¹

¹Department of Clinical and Toxicological Analyses – Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Nucleus of Research in Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil;

³Department of Biological Sciences – Institute of Exact and Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

Background: Genetic, immune and environmental factors are thought to be involved in preeclampsia/PE etiology. It is known that the renin-angiotensin-aldosterone system/RAAS plays a pivotal role in blood pressure regulation. Circulating and intrarenal RAAS are activated during normal pregnancy to control the salt-water balance and, hence, maternal blood pressure aiming the adequate placental perfusion. Estrogens exert their role through binding to a membrane-associated G-protein or to nuclear receptors/ESR1 and ESR2. Polymorphisms in the ESR1 gene have been associated with blood pressure variations. Considering that hypertension and poor placental perfusion are important features in PE, the investigation of polymorphisms in these genes are required to better understand the PE etiology.

Objective: To investigate if polymorphisms in angiotensin converting enzyme (ACE) and ESR1 were associated with PE occurrence.

Materials and methods: This case-control study included 209 Brazilian pregnant women (107 with severe PE and 102 normotensive controls). The polymorphisms were investigated by polymerase chain reaction (PCR) followed by polyacrylamide gel electrophoresis.

Results: There were no significant differences for the distribution of the alleles and genotypes frequencies (insertion/deletion polymorphism in intron 16) in the ACE gene and the single nucleotide polymorphisms (rs2234693 and rs9340799) in the ESR1 gene comparing PE versus normotensive pregnant, as well as comparing early versus late PE.

Conclusions: Our Brazilian pioneer study did not show association between ACE and ESR1 polymorphisms in PE occurrence in our population. However, other studies with a larger sample size are necessary to confirm our findings.

Support: CNPq (404353/2016-9) and FAPEMIG/BRAZIL (PPM-00764-16)

P018

Longitudinal assessment of PlGF, sFlt-1 and sFlt-1/PlGF in pregnant women with risk factors for preeclampsia

F.S. Mendes¹, F.C. Lucena¹, E.M. Lage², P.G. Teixeira², R. Diniz³, P.N. Alpoim¹, L.M.S. Dusse¹

¹Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Brazil; ²Fetal Medicine Center, Obstetrics and Gynecology Department, Federal University of Minas Gerais, Brazil;

³Department of Epidemiology, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Brazil

Background: An imbalance between angiogenic and anti-angiogenic factors has been admitted in preeclampsia/PE. Placental Growth Factor/PlGF is a pro-angiogenic factor involved with the proliferation and endothelial cells survival that induces vascular permeability. Soluble Fms tyrosine kinase type 1/sFlt-1 is an anti-angiogenic protein which blunts the effect of PlGF. Although several studies revealed lower PlGF and higher sFlt-1 levels in PE, it remains unclear whether the determination of these factors throughout pregnancy could predict the PE occurrence. The aim of this study was to evaluate PlGF, sFlt-1 and sFlt-1/PlGF ratio throughout pregnancy in women with risk factor for PE.

Materials and methods: This study was approved by Local Ethical Committee (UFMG/ETIC 0618.0.203.000-10) and enrolled 28 pregnant women with risk factors for PE. Samples were collected throughout gestation (12–19, 20–29, 30–34 and 35–40 weeks). PlGF and sFlt-1 plasma levels were determined by ELISA-CUSABIO/USA. Eleven pregnant women developed PE and 17 did not develop it.

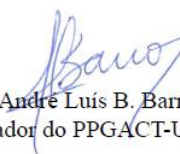
Results: Data are shown in Table 1. PlGF levels were increasing throughout gestation until 30–34 weeks in both groups. However, the increase is more

Certificamos que **ANA CRISTINA DOS SANTOS LOPES** participou do I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da UFMG, realizado no auditório da Faculdade de Farmácia da UFMG, em Belo Horizonte/MG, no dia 29 de agosto de 2019, com carga horária de 8 (oito) horas.



Belo Horizonte, 29 de agosto de 2019



Prof.^a Ana Paula L. Mota
Coordenadora do Simpósio SiACT



Prof. André Luis B. Barros
Coordenador do PPGACT-UFMG

		<h3>Assessment of endocan in early-onset and late-onset (severe) preeclampsia</h3> <p>A.C.S. LOPES¹, S.R. MARTINS¹, L.M.S. DUSSE¹ and P.N. ALPOIM¹. ¹Department of Clinical and Toxicological Analyses – Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.</p>			
<p>INTRODUCTION</p> <p>Endocan is a biochemical marker of endothelial dysfunction that is potentially associated with immunoinflammatory response [1;2]. It is known that endothelial dysfunction and inflammatory process are important features in preeclampsia (PE).</p>		<p>RESULTS</p> <p>Unexpectedly, no significant difference between PE (0.388 ng/mL [0.346-0.516]) versus normotensive pregnant (0.393 ng/mL [0.321-0.623]) women was observed (p = 0.870).</p> <p>Additionally, no significant difference was observed when comparing early (0.385 ng/mL [0.311-0.459]) versus late PE (0.407 ng/mL [0.313-0.500]) versus normotensive pregnant (0.393 ng/mL [0.244-0.542]) (p = 0.851).</p>			
<p>AIM</p> <p>To evaluate endocan levels in preeclamptic women as a potential marker for prognosis and monitoring of preeclampsia.</p>					
<p>METHOD</p> <ul style="list-style-type: none"> This case-control study included 80 Brazilian pregnant women, 40 with severe PE and 40 normotensive pregnant women (Controls). Endocan levels were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay. Statistical analysis was carried out using SPSS 19.0. Data normality was tested by Shapiro-Wilk test. The differences in endocan levels between the PE and normotensive groups were assessed by Mann-Whitney test. P values <0.05 were considered statistically significant. 		<p>CONCLUSIONS</p> <p>Our study showed no association between endocan levels and preeclampsia occurrence in Brazilian pregnant women, which suggests that this protein do not contribute to the preeclampsia occurrence in this population.</p>		<p>ACKNOWLEDGEMENTS</p> <p>This work was supported by FAPEMIG under Grant #00764-16 and CNPq/Brazil under Grant #404353/2016-9.</p>	
		<p>REFERENCES</p> <ol style="list-style-type: none"> Kali A, Shetty KS. Endocan: a novel circulating proteoglycan. <i>Indian J Pharmacol</i> 2014; 46(6): 579–583. Balta S et al. Endocan: A novel inflammatory indicator in cardiovascular disease?. <i>Atherosclerosis</i> 2015; 243(1): 339–343. 		<p>CONTACT INFORMATION</p> <p>Luci Maria Sant Ana Dusse, PhD Faculty of Pharmacy – Federal University of Minas Gerais Av. Antonio Carlos, 6627BI 3 room 4104 - Campus Pampulha Belo Horizonte – Minas Gerais – BRAZIL – 30270-901 Phone 55 31 3409-6880 55 31 3409-6900FAX: 55 31 3409-6985 e-mail: lucidusse@gmail.com</p>	

Certificate of Attendance



This is to certify that

Ana Cristina dos Santos Lopes

has attended the event

ISTH 2020 CONGRESS

held on

Sunday, July 12, 2020

to

Tuesday, July 14, 2020

Participação em banca de TCC

UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS, QUE

Profa. Dra. PATRÍCIA NESSRALLA ALPOIM – UFMG - orientadora, Mestranda LETÍCIA GONÇALVES SILVA – UFMG - coorientadora, Mestranda THÁISE EMILIA MOREIRA DA SILVA - coorientadora, DOUTORANDA ANA CRISTINA DOS SANTOS LOPES e Profa. LUCI MARIA SANT'ANA DUSSE participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada **CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DE MULHERES APÓS TEREM APRESENTADO PRÉ-ECLÂMPسيا EM SUAS GESTAÇÕES**, apresentada pela aluna **ISABELLA MACEDO COSTA**.

Belo Horizonte, 03 de outubro de 2022.


Prof. Dr. Marcio de Matos Coelho
Coordenador do Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia



FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha – CEP 31270-901 – Fone: 31 3409-6742/6743/6744
cografar@farmacia.ufmg.br www.farmacia.ufmg.br


1911

Coorientações de TCC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REGISTRO DE REUNIÃO

Ata referente à avaliação do conteúdo da Monografia de Conclusão de Curso do(a) estudante Thaíse Emilia Moreira da Silva para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Aos 22 dias do mês de outubro de 2020 às 0900 horas, pelo serviço de comunicação por vídeo Google Meet, realizou-se a sessão pública de avaliação da Monografia de Conclusão de Curso. Integraram a Comissão Examinadora a Professora da UFMG Doutora Patrícia Nessler Alpoim, (orientadora), a Doutoranda Ana Cristina dos Santos Lopes (coorientadora) e a Professora do COLTEC, Doutora Lara Carvalho Godoi (examinadora). A orientadora abriu a sessão agradecendo a participação dos membros da Comissão Examinadora. Em seguida convidou a estudante para realizar a exposição do conteúdo da monografia intitulada: "Avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais na pré-eclâmpsia: relato de caso." Finalizada a exposição, a estudante foi arguida pelas integrantes da Comissão Examinadora. Na sequência, as integrantes da Comissão Examinadora se reuniram, isoladamente, para deliberar sobre a Monografia de Conclusão de Curso. Terminada a deliberação, a orientadora procedeu à leitura da ata dos trabalhos. Com média final de 94,9 pontos e conceito A, a estudante foi declarada **aprovada** com base na pontuação registrada em Formulário de Avaliação do Colegiado do Curso de Biomedicina. Finalizando, a orientadora deu por encerrada a solenidade e lavrou a presente ata. As assinaturas dos membros da Comissão Examinadora foram realizadas digitalmente, por meio do SEI UFMG, ferramenta de suporte à produção, edição, assinatura e trâmite de processos e documentos, proporcionando desta forma, a virtualização destes.

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Nessler Alpoim

Coorientadora: Ana Cristina dos Santos Lopes

Examinadora: Professora Doutora Lara Carvalho Godoi.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina dos Santos Lopes, Usuário Externo**, em 27/10/2020, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Nessler Alpoim, Professora do Magistério Superior**, em 27/10/2020, às 20:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lara Carvalho Godoi, Professora Ensino Básico Técnico Tecnológico**, em 29/10/2020, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0337454 e o código CRC 5973FF8C.

Referência: Processo nº 23072.237342/2020-97

SEI nº 0337454

27/08/2023, 15:43

SEI/UFMG - 2316296 - Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DE COORDENAÇÃO DIDÁTICA DO CURSO DE FARMÁCIA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS QUE

Profa. Patrícia Nessralla Alpoim – orientador(a), Ana Cristina dos Santos Lopes – coorientador(a), Aislander Junio da Silva coorientador(a), Thaise Emilia Moreira da Silva, e Jesiel Francisco de Jesus Fernandes Martins participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada “Caracterização do ácido úrico na pré-eclâmpsia em fase precoce e tardia”, apresentada pelo(a) aluno(a) Jessica Souza de Jesus Almeida, no dia 22 de junho de 2023.

Belo Horizonte, 22 de junho de 2023

DIEGO DOS SANTOS FERREIRA
COORDENADOR DO COLEGIADO DE COORDENAÇÃO DIDÁTICA DO CURSO DE FARMÁCIA



Documento assinado eletronicamente por **Diego dos Santos Ferreira, Coordenador(a) de curso**, em 16/06/2023, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2316296 e o código CRC B839C9AD.

Referência: Processo nº 23072.209159/2021-82

SEI nº 2316296

Participação em projeto de extensão



Colegiado do Curso de Biomedicina
Faculdade de Farmácia
Universidade Federal de Minas Gerais



DECLARAÇÃO DE ACEITE DE SUPERVISÃO

Declaro, para os devidos fins, que concordo com a participação das alunas Ana Cristina dos Santos Lopes, Fernanda Santos Mendes, Letícia Gonçalves Silva e Thaíse Emilia Moreira da Silva, na realização do projeto de Extensão intitulado Ciência na Pré-Concepção, Gestação e Puerpério.

Objetivos do projeto: Levar à população conhecimentos científicos relacionados a gestação e suas transformações, de forma simples e objetiva, evidenciando os cuidados pré e pós-natais essenciais para a saúde da família. Ao mesmo tempo, proporcionar à equipe envolvida a oportunidade de atuar de forma mais próxima dos pacientes e complementar sua formação acadêmica.

Belo Horizonte, 31 de outubro de 2021.

Patricia
Nessralla
Alpoim:0711
4820631

Assinado de forma
digital por Patricia
Nessralla
Alpoim:07114820631
Dados: 2021.11.01
14:44:00 -03'00'

Patricia Nessralla Alpoim

