

EVALUACION DE FasL Y TRAIL EN MICROVESICULAS PROVENIENTES DE CULTIVOS DE EXPLANTOS DE PLACENTA DE MUJERES CON PRECLAMPSIA

Palabras Clave: Preeclampsia, apoptosis, microvesículas

1. INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es un desorden hipertensivo del embarazo que causa mortalidad y morbilidad fetal, neonatal y materna. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la incidencia a nivel mundial es del 2-8% de los embarazos (GDM, 2019) y en Colombia de aproximadamente el 30% (Khan, Wojdyla, Say, Gülmezoglu, & Van Look, 2006). La mortalidad materna asociada a esta patología es del 2,8% en el Reino Unido (2011-2013), 7,4% en los EE. UU. (2011-2013) (Shennan, Green, & Chappell, 2017), 9% en Asia y África, 26% en América Latina y el Caribe (Stegers, von Dadelszen, Duvekot, & Pijnenborg, 2010) y del 14,7% en Colombia (Instituto Nacional de Salud, 2018). Adicionalmente, se estima que la cuarta parte de las muertes fetales y neonatales mundiales está asociada con esta patología (500.000 neonatos por año) (Duley, 2009).

Durante el desarrollo de la PE se ha descrito un aumento en la proliferación y fusión del citotrofoblasto (CT), remodelación anormal/incompleta de las arterias espirales uterinas (AEU) e invasión fallida del trofoblasto, placentación anormal, insuficiencia placentaria y aumento en la liberación de factores placentarios y vesículas extracelulares (VE) con propiedades proinflamatorias, antiangiogénicas, protrombóticas y apoptóticas, posiblemente involucradas en la inflamación sistémica, disfunción endotelial y compromiso multisistémico característicos de esta patología (Tannetta, Masliukaite, Vatish, Redman, & Sargent, 2017).

Aunque su etiología y fisiopatología aún no son completamente claras, existe evidencia que indica, que la alteración de la apoptosis (mecanismo de muerte celular programada), está asociada con la reducción o formación irregular del sincitiotrofoblasto (STB), alteración en la remodelación de AEU, aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, disminución en la inmunotolerancia materno-fetal, activación o aumento en la expresión de

proteínas apoptóticas como FasL y TRAIL en VE liberadas por la placenta y por consiguiente al desarrollo de la PE (Sharp, Heazell, Crocker, & Mor, 2010).

Stenqvist et al., evidenciaron y compararon la expresión de FasL y TRAIL en exosomas provenientes de placentas en estadios temprano (8-14 semanas) con exosomas aislados de placentas de embarazos a término, además demostraron la capacidad de estas VE en la inducción de apoptosis de células inmunes activadas de manera dosis dependiente. Por consiguiente, este trabajo se enfoca en la identificación, cuantificación y comparación de la expresión de FasL y TRAIL en exosomas y cuerpos apoptóticos aislados de cultivo de explantos de placenta provenientes de gestantes diagnosticadas con preeclampsia y gestantes sin complicaciones durante el embarazo, adicionalmente, se pretende evaluar la capacidad de estas VE en la inducción de apoptosis de células T (línea celular Jurkat) como posible mecanismo de alteración en la inmunotolerancia materno-fetal característica de esta patología.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección de muestras

Este estudio se llevó a cabo en el Hospital Universitario San Ignacio (HUSI), entre febrero y diciembre de 2018. Las muestras utilizadas fueron placentas de gestantes sanas, que cursaron su embarazo sin ningún tipo de complicación y recién nacidos sanos (controles; n=7) y placentas de gestantes con diagnóstico de preeclampsia (casos; n=14). Los casos se dividen en 2 grupos de 7 muestras: Preeclampsia de inicio temprano (placentas provenientes de cesáreas cuyas madres fueron diagnosticadas con PE <34 semanas de gestación y Preeclampsia de inicio tardío (placentas provenientes de cesáreas cuyas madres fueron diagnosticadas con PE \geq 34 semanas de gestación).

Inicialmente, Se revisó la historia clínica de las posibles participantes y se estableció si cumplían con los criterios de inclusión del estudio. Posteriormente se les informó sobre el proyecto y al acceder a participar en el mismo, se procedió a firmar el consentimiento informado (aprobado por el Comité de Ética del HUSI).

Las placentas se tomaron de partos por cesáreas, se trasladaron en contenedores plásticos a Patología, donde fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento (<12 horas).

2.2. Cultivo de explantos

Por medio de disección estéril se separó un cotiledón del resto de la placenta, se retiraron las placas coriónica y basal del mismo, utilizando pinzas y bisturí. Se realizaron lavados con solución salina al 0,9% hasta eliminar la sangre del espacio intersticial y posteriormente se procedió a cortar pequeños fragmentos (explantos) de aproximadamente 0,5 µm en cama de hielo. Se utilizaron 2 cajas de poliestileno de 6 pozos para cada muestra. Se incubaron 4 explantos en 8mL de medio DMEN (Gibco BRL, Bethesda, MD, USA) por pozo a 37°C (5% de CO₂) durante 24 horas (Miller *et al.*, 2005). Se realizó una revisión microscópica de la morfología de los explantos y pruebas de viabilidad (MTT) y funcionalidad celular (hCG) del cultivo.

2.3. Obtención y estudio de Microvesículas

Para el aislamiento de cuerpos apoptóticos se centrifugó el sobrenadante de los cultivos de explantos a 4.000g durante 30 minutos, el pellet fue almacenado en viales estériles de 1.5mL a -20°C (Bautista, Rodríguez, Franco, Angel, & Barreto, 2015). El aislamiento de exosomas consistió en tomar el sobrenadante de los cultivos celulares y ultracentrifugarlos inicialmente a 100.000g por 1 hora 40 y en una segunda ultracentrifugación a 100.000g por 90 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 50µL de PBS1X mediante raspado de fondo del tubo. El pellet fue almacenado en viales estériles de 1.5mL a -20°C (Bautista *et al.*, 2015).

La confirmación del aislamiento y la cuantificación de las microvesículas se realizó por análisis de seguimiento de nanopartículas, Western blot (CD63 para exosomas y H3 para cuerpos apoptóticos) y ELISA mediante el kit *ExoQuant™ Overall Exosome Capture and Quantification Assay Kit* (BioVision, Milpitas, CA, USA) para exosomas y kit *Histone H3 Colorimetric Cell-Based ELISA* (Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA) para cuerpos apoptóticos.

2.4. Cuantificación de FasL y TRAIL.

Para la cuantificación de FasL en cuerpos apoptóticos y exosomas se utilizó el kit de ELISA *Fas Ligand (APTL) Human* (Abcam, Cambridge, MA, USA) y la cuantificación de TRAIL en cuerpos apoptóticos y exosomas se realizó mediante el kit de ELISA *Human*

TRAIL/TNFSF10 (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) (Elabscience, Houston, Texas, USA).

2.5. Inducción de apoptosis

La determinación de la capacidad de inducción de apoptosis de las VE aisladas se realizó mediante el ensayo de TUNEL. Se sembraron 400.000 células Jurkat en 1mL de medio RPMI suplementado y se colocaron los tratamientos control (CA y Exosomas) y caso (CA y Exosomas), a diferentes concentraciones. El análisis de la inducción de la apoptosis se realizó a las 0,8 y 24 horas.

3. RESULTADOS

Inicialmente, se realizó un análisis de las características de la población, en donde se evaluaron variables como la edad materna, edad gestacional del diagnóstico de preeclampsia (casos), número de gestaciones, cifras tensionales, peso del recién nacido (RN), sexo del recién nacido, edad gestacional de la cesárea, peso de la placenta, proteinuria en muestra aislada (relación proteinuria/creatinina), relación peso placenta/peso RN y presencia de RCIU.

El peso del RN, la edad gestacional al momento de la cesárea y la relación peso placenta/peso RN presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles. El peso del RN es menor en los casos ($p=0,0001$), especialmente en los de PE de inicio temprano ($p=0,0006$) en comparación con los controles. En cuanto a la edad gestacional al momento del parto es menor en los casos ($p<0,0001$) principalmente en los de PE de inicio temprano ($p=0,0006$) en relación a los controles. Por último, la relación peso placenta/ peso RN es mayor en los casos ($p=0,0245$) primordialmente en los casos de PE de inicio temprano ($p=0,0379$) en comparación a los controles.

En cuanto a las cifras tensionales, de las 14 gestante diagnosticadas con PE, 8 (57,1%) gestantes presentaron PE con criterios de severidad (cifras tensionales ≥ 160 mm Hg / ≥ 110 mm Hg). Adicionalmente, la relación proteinuria/creatinina indica que 11 (78,5%) gestantes diagnosticadas con PE presentaron proteinuria.

Con respecto, a las pruebas de viabilidad del cultivo se evidencio una relación inversamente proporcional, es decir que a mayor tamaño del explanto, menor es la viabilidad del cultivo celular ($p < 0,0001$). La concentración evaluada de β -hCG fue en promedio de 484,7 pg/mL mostrando la funcionalidad biológica de las células durante el cultivo ($p < 0,0001$).

Los resultados del análisis de seguimiento de nanopartículas permiten corroborar el aislamiento de vesículas extracelulares (cuerpos apoptóticos y exosomas) (Dragovic *et al.*, 2015). La media del tamaño de los cuerpos apoptóticos fue de 209,3nm, la desviación estándar de 74,4nm y la concentración de $9,62e+08 \pm 1,11e+08$ partículas/ml (Figura 15A y 15B). Por otra parte, la media del tamaño de los exosomas fue de 149,4nm, la desviación estándar de 83,5nm y la concentración de $8,93e+08 \pm 3,74e+07$ partículas/ml. En cuanto al Western blot para CD63 (exosomas) se evidencio una banda de ~55 kDa, y para Histona H3 (cuerpos apoptóticos) una banda de ~17 kDa, indicando el aislamiento correcto de estas microvesículas, consistente con la literatura.

La cuantificación de cuerpos apoptóticos mediante ELISA, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles ($p = 0,5724$). La concentración de exosomas entre casos y controles no mostro diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0968$), sin embargo, si se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los casos de PE temprana ($p = 0,0012$) y entre los subgrupos de PE temprana y PE tardía ($p = 0,008$), evidenciando una concentración menor de exosomas en PE temprana en ambos casos.

La expresión de FasL en cuerpos apoptóticos no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles ($p = 0,8612$). Al evaluar las diferencias entre los controles y los subgrupos de los casos, se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los casos de PE temprana ($p = 0,0012$), siendo mayor la concentración en los controles, e igualmente, entre los controles y los casos de PE tardía ($p = 0,0012$) con una mayor concentración en los casos de PE tardía. Adicionalmente, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos subgrupos de casos ($p = 0,0012$), siendo mayor la concentración en los casos de PE tardía (Figura 1A). En cuanto a la expresión de FasL en exosomas no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles ($p = 0,0683$). Al evaluar las diferencias entre los controles y los

subgrupos de los casos, se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los casos de PE temprana ($p=0,0379$), siendo mayor la concentración en los casos de PE temprana ($p=0,0012$) (Figura 1B).

Los resultados de TRAIL en cuerpos apoptóticos permiten evidenciar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles ($p=0,1522$) (Figura 1C). De igual forma, en cuanto a la expresión de TRAIL en exosomas no se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles ($p=0,9351$) (Figura 1D).

Por otro lado, los resultados de apoptosis de las células Jurkat tratadas con cuerpos apoptóticos y exosomas muestran un aumento directamente proporcional entre el aumento en la concentración del tratamiento y el porcentaje de fragmentación del ADN, adicionalmente, se observa un mayor porcentaje de apoptosis en las células tratadas con microvesículas aisladas del sobrenadante de cultivo de explantos de placenta de gestantes con diagnóstico de PE. Adicionalmente, se evidencia una disminución del porcentaje de apoptosis a las 24h en comparación con las 8h.

4. DISCUSION

Como se evidencia en los análisis de las características demográficas de la población evaluada, las gestantes con PE de inicio temprano presentaron resultados obstétricos menos favorables con cifras tensionales altas (criterio de severidad), partos prematuros (\leq semana 36 de gestación) y bajo peso del recién nacido, en comparación con los controles y las gestantes con PE de inicio tardío, lo cual es congruente con algunos estudios previos (Lok *et al.*, 2008) (Nguyen, Patrick, Parry, & Familari, 2019).

Los resultados de este estudio muestran una disminución en la concentración de exosomas en los casos de PE de inicio temprano en comparación con los controles y los casos de PE de inicio tardío, esto podría deberse al aumento progresivo de la liberación de VE a lo largo de la gestación siendo mayor en partos a término y gestantes con PE tardía (Pillay *et al.*, 2016). Distintos autores han encontrado un aumento significativo de exosomas circulantes en

gestantes con PE de inicio temprano, posiblemente asociado al desarrollo anormal y disminución en la funcionalidad de la placenta (Lok *et al.*, 2008) (Redman *et al.*, 2012) (Pillay *et al.*, 2016), mientras, otros autores no reportan diferencias significativas en la concentración de VE de gestante con PE en comparación con gestantes normotensas (Marques *et al.*, 2012). La discrepancia en estos resultados puede deberse al tipo de muestra evaluada, metodologías de aislamiento e identificación de las mismas (Dragovic *et al.*, 2013). Mitchell *et al.*, plantea que la liberación de exosomas puede reflejar la función de la placenta y su estatus metabólico, por lo cual la disminución en la liberación de exosomas en PE de inicio temprano podría estar asociada a la disfunción placentaria evidenciada durante esta patología. Adicionalmente, durante el desarrollo de la PE de inicio temprano se ha visto una mayor tasa de apoptosis en el STB (Gilani *et al.*, 2016), lo que podría suponer una disminución en la cantidad de células que liberen VE o una disminución en la concentración de VE liberadas (Balaj *et al.*, 2011).

Algunos estudios han demostrado el efecto de los exosomas derivados de la placenta en la modulación inmune materna durante el embarazo, activando la expresión de moléculas proapoptóticas como FasL y TRAIL (Mitchell *et al.*, 2015). FasL induce la estimulación/activación del endotelio vascular, además de una alteración en la apoptosis del trofoblasto, que da lugar a la disfunción endotelial, inflamación sistémica e hipertensión, (Gibbens, Morris, Bowles, Spencer, & Wallace, 2017), características etiológicas de la PE de inicio tardío, lo cual podría explicar el aumento de la expresión de esta proteína en cuerpos apoptóticos en el grupo de PE de inicio tardío. Por otra parte, también se ha reportado que FasL puede inducir apoptosis en linfocitos activados como mecanismo de tolerancia placentaria y privilegio inmune (Jerzak & Bischof, 2002), además de estar implicado en la remodelación de las AEU (Bai *et al.*, 2009), rasgos de la etiología de la PE de inicio temprano, posiblemente asociado al aumento de la expresión de esta proteína en exosomas durante la PE de inicio temprano.

Con respecto a TRAIL, los resultados de este estudio permiten evidenciar un aumento en la expresión de TRAIL por exosomas en el grupo de PE de inicio temprano en comparación con los controles y los casos de PE de inicio tardío, hallazgos semejantes para FasL en exosomas, esto puede darse como respuesta ante la reducción o pérdida funcional del STB

causada por la alteración del proceso de apoptosis durante la PE (Bai *et al.*, 2009) y/o al aumento en la inducción de apoptosis en linfocitos activados como mecanismo de defensa contra el rechazo del aloinjerto fetal por el sistema inmune materno (Stenqvist *et al.*, 2013).

Algunos estudios previos *in vitro* han señalado que las VE provenientes de placenta (expresión de PLAP) y aisladas de suero de gestantes sanas, inducen un aumento significativo (3.38 veces) en la apoptosis de células T (línea celular Jurkat), en comparación con VE aislada de suero de mujeres control (no gestantes), adicionalmente, demuestran la inducción de la apoptosis dependiente del complejo Fas/FasL (Gercel-Taylor, O'Connor, Lam, & Taylor, 2002). Por otra parte, Gupta *et al.*, evidenciaron que las VE derivadas del cultivo de explantos de placenta de gestantes sin complicaciones pueden estar implicadas en la respuesta de las células T activadas (reducen la proliferación de linfocitos T y la producción de IL-2 e IFN γ), sin embargo, no observaron inducción de la apoptosis en estas células (Gupta, Rusterholz, Holzgreve, & Hahn, 2005). Los resultados de este estudio a nivel *in vitro* demuestran que las VE (cuerpos apoptóticos y exosomas) aisladas del cultivo de explantos de placenta de gestantes sanas y gestantes con diagnóstico de preeclampsia, y que expresan FasL y TRAIL, son capaces de desencadenar la apoptosis en células Jurkat de manera concentración-dependiente, así como se muestra en los ensayos de Stenqvist *et al.*

De igual forma, se logró establecer que existe una mayor inducción de apoptosis por parte de VE provenientes de placentas de gestantes diagnosticadas con PE. Esto podría deberse al desencadenamiento de una mayor protección de la unidad fetoplacentaria ante las células inmunes maternas activadas (Nair & Salomon, 2018), o a la inhibición de la activación y proliferación de linfocitos T (Gupta *et al.*, 2005), además de la alteración del contenido lipídico y proteico de las VE generando un mayor grado de apoptosis en las células diana (Gilani *et al.*, 2016).

Por otro lado, los análisis de apoptosis con los distintos tratamientos a las 8h y 24h, muestran una disminución en el porcentaje de apoptosis a las 24h. Zhang *et al.*, realizaron un trabajo basado en estudios que reportan la capacidad fagocítica de los linfocitos T, en el cual exponen Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) a células Jurkat, evidenciando algunos cambios morfológicos (remodelación del citoesqueleto, superficies celulares arrugadas, formación de

pseudópodos) de las células Jurkat asociados a la inducción de una forma de endocitosis no selectiva denominada macropinocitosis (Zhang *et al.*, 2015). Esta capacidad fagocítica de las células Jurkat, podría explicar la disminución del porcentaje de células apoptóticas a través del tiempo.

5. CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de VE (cuerpos apoptóticos y exosomas) a partir del cultivo de explantos de placenta de gestantes diagnosticadas con preeclampsia (tardía y temprana) y gestantes con embarazo sin complicaciones y recién nacidos sanos. Adicionalmente, se determinó y cuantificó la expresión de proteínas apoptóticas (FasL y TRAIL) de estas VE, siendo el primer estudio que evalúa y compara la expresión de estas proteínas en cuerpos apoptóticos y exosomas entre gestantes diagnosticadas con preeclampsia y gestantes normotensas.

De igual forma, se evidenció la funcionalidad de las proteínas FasL y TRAIL, expresada en VE aisladas de cultivo de explantos de placenta de gestantes diagnosticadas con preeclampsia (pool) y gestantes con embarazo sin complicaciones, mediante los experimentos *in vitro* de inducción de apoptosis en células Jurkat.

Los resultados de este estudio permiten evidenciar una asociación entre la expresión de las proteínas apoptóticas FasL y TRAIL en cuerpos apoptóticos y el desarrollo de PE de inicio temprano, además de una relación de la expresión de FasL y TRAIL en exosomas con el desarrollo de PE de inicio tardío. Esta hipótesis podría soportar las diferencias en la fisiopatología, mecanismos y proteínas implicadas entre la PE de inicio temprano y la PE de inicio tardío.

FIGURA

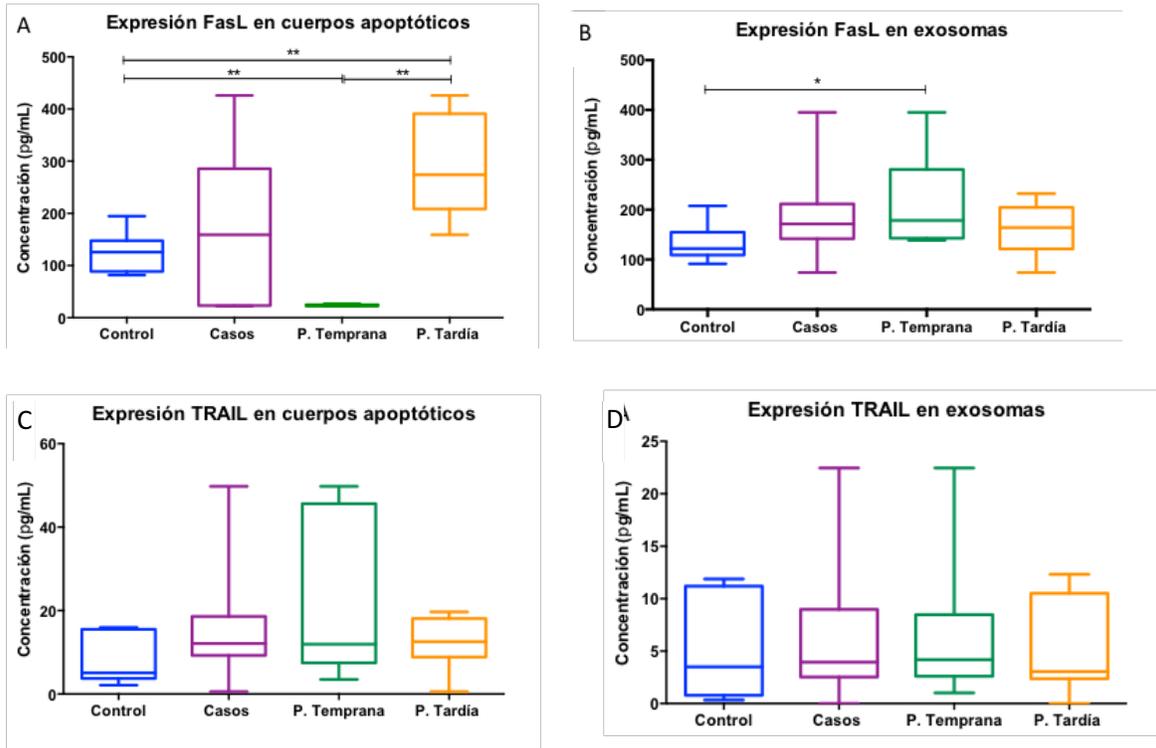


Figura 1. Cuantificación de expresión de FasL y TRAIL. A) Concentración FasL en cuerpo apoptóticos. B) Concentración FasL en exosomas. C) Concentración TRAIL en cuerpo apoptóticos. D) Concentración TRAIL en exosomas. *Análisis estadístico Mann-Whitney. $p \leq 0,05$ (*) y $p \leq 0,01$ (**).*

REFERENCIAS

- Bai, X., Williams, J. L. R., Greenwood, S. L., Baker, P. N., Aplin, J. D., & Crocker, I. P. (2009). A Placental Protective Role for Trophoblast-Derived TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). *Placenta*, *30*(10), 855–860. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.07.006>
- Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.-J., Pomeroy, S. L., Breakefield, X. O., & Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications*, *2*(1), 180. <https://doi.org/10.1038/ncomms1180>

- Bautista, D., Rodríguez, L.-S., Franco, M. A., Angel, J., & Barreto, A. (2015). Caco-2 cells infected with rotavirus release extracellular vesicles that express markers of apoptotic bodies and exosomes. *Cell Stress and Chaperones*, *20*(4), 697–708.
<https://doi.org/10.1007/s12192-015-0597-9>
- Dragovic, R. A., Southcombe, J. H., Tannetta, D. S., Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2013). Multicolor Flow Cytometry and Nanoparticle Tracking Analysis of Extracellular Vesicles in the Plasma of Normal Pregnant and Pre-eclamptic Women. *Biology of Reproduction*, *89*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.113266>
- Duley, L. (2009). The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Seminars in Perinatology*, *33*(3), 130–137. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2009.02.010>
- GDM, A. (2019). *Clinical Management Guidelines for Obstetrician – Gynecologists Gestational Hypertension and*. *133*(1), 1–25.
- Gercel-Taylor, C., O'Connor, S. M., Lam, G. K., & Taylor, D. D. (2002). Shed membrane fragment modulation of CD3-zeta during pregnancy: Link with induction of apoptosis. *Journal of Reproductive Immunology*, *56*(1–2), 29–44. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(02\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(02)00025-6)
- Gibbens, J., Morris, R., Bowles, T., Spencer, S.-K., & Wallace, K. (2017). Dysregulation of the Fas/FasL system in an experimental animal model of HELLP syndrome. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, *8*(24), 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2017.02.004>
- Gilani, S. I., Weissgerber, T. L., Garovic, V. D., & Jayachandran, M. (2016). Preeclampsia and Extracellular Vesicles. *Current Hypertension Reports*, *18*(9), 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s11906-016-0678-x>
- Instituto Nacional de Salud. (2018). *Iqen Informe Quincenal Epidemiológico Nacional*. Retrieved from https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/IQEN/IQEN_vol_23_2018_num_20.pdf
- Jerzak, M., & Bischof, P. (2002). Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast

remodelling. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 100(2), 138–142. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750952>

Khan, K. S., Wojdyla, D., Say, L., Gülmezoglu, A. M., & Van Look, P. F. (2006). WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*, 367(9516), 1066–1074. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68397-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68397-9)

Lok, C. A. R., Van Der Post, J. A. M., Sargent, I. L., Hau, C. M., Sturk, A., Boer, K., & Nieuwland, R. (2008). Changes in microparticle numbers and cellular origin during pregnancy and preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, 27(4), 344–360. <https://doi.org/10.1080/10641950801955733>

Marques, F. K., Campos, F. M. F., Filho, O. A. M., Carvalho, A. T., Dusse, L. M. S., & Gomes, K. B. (2012). Circulating microparticles in severe preeclampsia. *Clinica Chimica Acta*, 414, 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.023>

Miller, R. K., Genbacev, O., Turner, M. A., Aplin, J. D., Caniggia, I., & Huppertz, B. (2005). Human placental explants in culture: Approaches and assessments. *Placenta*, 26(6), 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.10.002>

Mitchell, M. D., Peiris, H. N., Kobayashi, M., Koh, Y. Q., Duncombe, G., Illanes, S. E., ... Salomon, C. (2015). Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4), S173–S181. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.001>

Nair, S., & Salomon, C. (2018). Extracellular vesicles and their immunomodulatory functions in pregnancy. *Seminars in Immunopathology*, 40(5), 425–437. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0680-2>

<https://doi.org/10.4103/0377-4929.77317>

Nguyen, T. P. H., Patrick, C. J., Parry, L. J., & Familiar, M. (2019). Using proteomics to advance the search for potential biomarkers for preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 14(4), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214671>

Pillay, P., Maharaj, N., Moodley, J., & Mackraj, I. (2016). Placental exosomes and preeclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset

pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*, 46, 18–25.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.08.078>

Redman, C. W. G., Tannetta, D. S., Dragovic, R. A., Gardiner, C., Southcombe, J. H., Collett, G. P., & Sargent, I. L. (2012). Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*, 33(SUPPL.), S48–S54.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.12.006>

Sharp, A. N., Heazell, A. E. P., Crocker, I. P., & Mor, G. (2010). Placental Apoptosis in Health and Disease. *American Journal of Reproductive Immunology*, 64(3), 159–169.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00837.x>

Shennan, A. H., Green, M., & Chappell, L. C. (2017). Maternal deaths in the UK: pre-eclampsia deaths are avoidable. *The Lancet*, 389(10069), 582–584.

[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30184-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30184-8)

Stegers, E. A., von Dadelszen, P., Duvekot, J. J., & Pijnenborg, R. (2010). Pre-eclampsia. *The Lancet*, 376(9741), 631–644. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60279-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60279-6)

Stenqvist, A.-C., Nagaeva, O., Baranov, V., & Mincheva-Nilsson, L. (2013). Exosomes Secreted by Human Placenta Carry Functional Fas Ligand and TRAIL Molecules and Convey Apoptosis in Activated Immune Cells, Suggesting Exosome-Mediated Immune Privilege of the Fetus. *The Journal of Immunology*, 191(11), 5515–5523.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301885>

Tannetta, D., Masliukaite, I., Vatish, M., Redman, C., & Sargent, I. (2017). Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, 119, 98–106.

<https://doi.org/10.1016/J.JRI.2016.08.008>

Zhang, M., Zhu, Q., Shi, M., Liu, Y., Ma, L., Yang, Y., ... Zhao, G. (2015). Active phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) by T lymphocytes (Jurkat cells). *Molecular Immunology*, 66, 429–438.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.018>