

Vanessa Silvestre Innocenti Giorgi

**Determinação de adenosina deaminase, fator de  
necrose tumoral-alfa e interleucina-1 em gestantes  
portadoras de pré-eclâmpsia**

Trabalho de Conclusão de Curso realizado no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, apresentado ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Therezinha Medeiros Borges

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Giorgi, Vanessa Silvestre Innocenti.

Determinação de adenosina deaminase, fator de necrose tumoral-alfa e interleucina-1 em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Vanessa Silvestre Innocenti Giorgi. – Botucatu : [s. n], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Therezinha Medeiros Borges

Co-orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Capes: 40101150

1. Mulheres grávidas. 2. Pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: Adenosina deaminase; IL-1 $\beta$ ; Pré-eclâmpsia; TNF- $\alpha$ .

Aos meus amigos e à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Gratidão é uma palavra linda e simples cujo significado aprendi desde cedo. Primeiramente, muito obrigada aos meus pais, Fábio e Ivone, que me ensinaram o valor desta palavra, que deram todo o suporte para os meus estudos e todo amor e carinho do mundo. Às minhas amadas irmãs, Anna Paula e Bruna, por serem pessoas sempre presentes na minha vida, mesmo que a distância nos impedisse de um longo abraço. Ao meu namorado Thiago por suportar as minhas longas (na verdade, curtas demais) conversas e sempre me consolar nas horas difíceis. À minha família, por depositar uma expectativa imensa na minha graduação e sempre me incentivar.

Meus sinceros agradecimentos à minha mestra, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> MariaTerezinha Serrão Peraçoli. Obrigada por todos os incentivos, pelo apoio, pelos bons conselhos, por sempre estar de braços abertos para me acolher, e por ser um exemplo na minha vida acadêmica, científica e pessoal.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Therezinha Medeiros Borges por me orientar e por confiar em meu trabalho. Muito obrigada!

Ao Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas de Botucatu, especialmente à Dr<sup>a</sup> Adriana Polachini do Valle, à Maria Salete Sartori e ao laboratório de Bioquímica que me acolheram muito bem e que me auxiliaram da forma mais prestativa possível na dosagem da ADA.

Aos meus AMIGOS de laboratório, Camila, Ingrid, Mariana, Leonardo e Vanessa, por todos os ensinamentos e sorrisos, por me propiciarem um dia-a-dia agradável. Obrigada pelos inesquecíveis momentos compartilhados!

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), local onde pude desenvolver a grande maioria das atividades deste projeto e onde passei boa parte da minha graduação. Muito obrigada aos docentes, funcionários e demais alunos.

Aos meus amigos da 44<sup>a</sup> turma de Biomedicina do IB – UNESP Botucatu e à comissão organizadora do 14<sup>o</sup> Encontro Nacional de Biomedicina, pessoas que eu aprendi a amar e que hoje defendo com muita garra.

Às minhas queridas amigas, Marila, Aninha, Natália, Tânia, Karina, obrigada pelos telefonemas de finais de semana e pelos e-mails descontraídos. Às minhas mais novas amigas, Dafne e Andressa (e mais uma vez, a Marila), por me “aturarem” um mês dentro de casa e por me tratarem como irmã.

Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste pequeno trabalho. Não tenho outra palavra para usar que não seja GRATIDÃO!

“A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte!”

Gandhi

## RESUMO

A pré-eclâmpsia é uma síndrome específica da gravidez, caracterizada por hipertensão arterial e proteinúria, identificadas após a 20<sup>a</sup> semana de gestação. Essa patologia está associada com hiperuricemia, níveis séricos elevados de citocinas inflamatórias, ativação de leucócitos e estresse oxidativo. A adenosina deaminase (ADA) é uma enzima presente em todos os tecidos e está envolvida com a maturação de células do sistema imunológico. Apesar de suas funções não estarem completamente elucidadas, a ADA é considerada um indicador de inflamação celular e, o aumento de sua concentração no soro é observado em doenças inflamatórias, como tuberculose e artrite reumatóide. O presente projeto teve por objetivo avaliar a concentração sérica de ADA em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) comparadas a gestantes normotensas (GN) e mulheres não-grávidas (NG) e correlacionar esses valores com a produção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Foram avaliadas 90 gestantes, sendo 60 portadoras de pré-eclâmpsia e 30 gestantes normotensas, pareadas pela idade gestacional. Como controle foram incluídas 20 mulheres saudáveis não-grávidas pareadas com as gestantes pela faixa etária. Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) obtidas dos três grupos foram cultivadas na ausência ou presença de lipopolissacáride (LPS) por 18h a 37°C e a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$  foi avaliada no sobrenadante de cultura dessas células por ensaio imunoenzimático (ELISA). A concentração plasmática de ADA foi determinada, por método colorimétrico. Os resultados mostram que os níveis de ADA foram significativamente mais elevados no plasma de gestantes com PE em comparação aos grupos GN e NG, havendo correlação positiva com os níveis de ácido úrico nas gestantes pré-eclâmpicas. Não houve diferença significativa nos níveis de ADA quando as gestantes com PE foram classificadas em PE precoce e PE tardia. A produção endógena de IL-1  $\beta$  e de TNF- $\alpha$  por PBMC foi significativamente maior no grupo de gestantes com PE em relação às GN e NG, mostrando o estado ativado dessas células na pré-eclâmpsia. O estímulo das células com LPS levou à produção de níveis significativamente mais elevados das duas citocinas nos três grupos estudados. Porém, a síntese de TNF- $\alpha$  pelas células das gestantes com PE foi significativamente menor em relação aos outros dois grupos estudados, sugerindo tolerância ao estímulo in vitro com LPS. A comparação entre as gestantes com PE precoce e tardia com relação aos níveis das IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$  mostrou que a produção endógena de IL-1  $\beta$  foi significativamente

maior no grupo com PE tardia, enquanto a concentração de TNF- $\alpha$  foi semelhante nos dois grupos. Os resultados confirmam o estado ativado dos leucócitos de gestantes com pré-eclâmpsia pela produção elevada de citocinas pró-inflamatórias. A associação entre a hiperuricemia e os níveis elevados de ADA nas gestantes pré-eclâmplicas sugere a participação dessa enzima na inflamação sistêmica observada na PE.

**Palavras-chave:** Pré-eclâmpsia; Adenosina Deaminase; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ .

## ABSTRACT

Preeclampsia is a specific disorder of pregnancy, characterized by arterial hypertension and proteinuria detected after 20 weeks of gestation. This pathology is associated with hyperuricemia, higher levels of pro-inflammatory cytokines, enhanced leukocyte activation and oxidative stress. Adenosine deaminase (ADA) is an enzyme present in all human tissues and, it is involved with the maturation of the immune system. Although its function is not fully understood, ADA is considered an indicator of cellular inflammation and, its increased serum concentration is observed in inflammatory diseases, such as tuberculosis and rheumatoid arthritis. This study aimed to assess serum ADA levels in preeclamptic patients (PE) compared with normotensive pregnant (NT) and non-pregnant women (NP), and to correlate these values with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production. Ninety pregnant women were included: 60 were pre-eclamptic and 30 were normotensive matched for gestational age. As control group 20 healthy non-pregnant women matched with pregnant for age were included. Peripheral blood mononuclear cells (PMMC) obtained from the three groups studied were cultured with or without lipopolysaccharide (LPS) for 18h at 37°C, and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production was assessed in the supernatant of cultures by enzyme immunoassay (ELISA). ADA plasmatic concentration was determined by colorimetric method. The results show that ADA plasma levels were significantly higher in PE group compared with NT and NP groups. A positive correlation between ADA and uric acid levels was detected in preeclamptic women. There was no significant difference in relation to ADA levels when PE patients were classified in early and late-onset PE. The endogenous production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by PBMC was significantly higher in PE group than in NT and NP women, showing the activation state of these cells in PE. LPS induced increased production of these cytokines in the three groups studied. However, TNF- $\alpha$  synthesis by PE cells was significantly lower than the other two groups, suggesting tolerance to LPS stimulus in vitro. The comparison of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels between early and late-onset PE show that the endogenous production of IL-1 $\beta$  was higher in late-onset PE, while TNF- $\alpha$  concentration was similar in both groups. The results confirm the monocyte activation in PE women by elevated pro-inflammatory cytokines synthesis. The association between hyperuricemia and increased ADA levels in PE suggest that ADA plays an important role in the systemic inflammation observed in PE.



**Key Word:** Preeclampsia; Adenosine Deaminase; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ .

## SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
3. Casuística e métodos.....	14
3.1. Casuística.....	14
3.2. Critérios de inclusão.....	15
3.3. Critérios de exclusão.....	15
3.4. Obtenção de plasma e isolamento e cultura de células mononucleares .....	15
3.5. Obtenção de sobrenadantes de cultura de PBMC.....	16
3.6. Determinação de citocinas no sobrenadante de PBMC.....	16
3.7. Determinação da atividade da adenosina deaminase plasmática.....	17
3.8. Análise estatística.....	17
4. Resultados.....	18
4.1. Características das gestantes e mulheres não-grávidas.....	18
4.2. Determinação da atividade da Adenosina Deaminase .....	18
4.3. Produção de IL-1 $\beta$ por células mononucleares de gestantes normais, portadoras de pré-eclâmpsia e de mulheres não-grávidas .....	20
4.4. Produção de TNF- $\alpha$ por células mononucleares de gestantes normais, portadoras de pré-eclâmpsia e de mulheres não-grávidas .....	21
4.5. Produção de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ por células mononucleares de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia precoce e tardia .....	21

5. Discussão.....	24
6. Referências Bibliográficas.....	30

## 1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação humana, clinicamente caracterizada por hipertensão e proteinúria, que se manifestam a partir da 20<sup>a</sup> semana de gestação (ACOG, 2002). É a principal causa de morbidade e mortalidade materna e fetal (SAITO et al., 2007), e sua incidência varia de 5 a 7% (UNAL et al., 2007). Esta é uma doença multissistêmica e sua fisiopatologia é centrada na lesão endotelial e na inadequada invasão citotrofoblástica endovascular (DEKKER & SIBAI, 1998).

Clinicamente é classificada em leve e grave, de acordo com sinais e sintomas apresentados (ACOG, 2002) e recentemente, em pré-eclâmpsia precoce ou tardia, na dependência do momento da identificação das manifestações clínicas, antes da 34<sup>a</sup>. ou a partir da 34<sup>a</sup>. semana de gestação, respectivamente (VON DADELSZEN et al., 2003; HUPPERTZ, 2008).

De acordo com HUPPERTZ (2008), PE de início precoce ou tardio são duas entidades que diferem quanto à etiologia e quanto à forma de manifestação da doença. Quando seu aparecimento é precoce apresenta-se na forma grave e está geralmente associada com resultado anormal do Doppler da artéria uterina, fetos com restrição de crescimento intra-uterino, complicações maternas e fetais (MURPHY & STIRRAT, 2000; NESS & SIBAI, 2006). Também existe evidência epidemiológica que a PE de início precoce está associada com maior risco de recorrência em gestações posteriores (SIBAI, 1991; REDMAN & SARGENT, 2005) e aumento do risco de desenvolver doença cardiovascular e morte (SIBAI et al., 1986; IRGENS et al., 2001; SMITH et al., 2001). Por outro lado, a PE tardia está frequentemente associada com índice de resistência uterina normal ou discretamente aumentado, baixa taxa de comprometimento fetal e resultados perinatais mais favoráveis (SIBAI et al., 2005; NESS & SIBAI, 2006).

Segundo MOLDENHAUER et al. (2003), a PE precoce está associada com lesões isquêmicas placentárias, o que não se verifica na PE tardia. Assim, a PE precoce decorre de anomalia da remodelação vascular placentária, sem alterações primárias do sistema vascular materno, correspondendo ao defeito da invasão das células citotrofoblásticas nas arteríolas espiraladas. Seu componente genético familiar é mais acentuado e seu prognóstico mais sombrio. Por outro lado, a PE tardia resulta da interação entre placenta normal e alteração inicial da rede vascular materna. Esta vasculopatia materna é favorecida por fatores de risco vascular

inespecíficos como diabetes, idade, hipertensão arterial e índice de massa corpórea aumentado. Representa obstáculo ao desenvolvimento da vascularização, observado fisiologicamente no final da gestação, em resposta a importantes necessidades hemodinâmicas fetoplacentárias (BOULANGER & FLAMANT, 2007).

Embora a etiologia da PE não esteja ainda esclarecida, vários fatores de risco têm sido descritos, como gestação múltipla, doença vascular, nefropatia, obesidade, idade materna acima de 35 anos, entre outros (ACOG, 2002; ROBILLARD et al., 2011; TROGSTAD et al., 2011). A PE parece ser resultante de uma ativação exacerbada da resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias, como monócitos e granulócitos, bem como células endoteliais, que são parte do sistema inflamatório (REDMAN et al., 1999; BORZYCHOWSKI et al., 2006). Essa patologia é caracterizada por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (REDMAN & SARGENT, 2003; LUPPI & DELOIA, 2006; PERAÇOLI et al., 2007) e quimiocinas (VISSER et al., 2007), bem como por alterações na produção de citocinas reguladoras, como Interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ) (VISSER et al., 2007; PERAÇOLI et al., 2008).

O fator de transcrição nuclear-kB, responsável pela transcrição de genes relacionados com a inflamação, também apresenta uma maior atividade em monócitos de gestantes com PE (LUPPI et al., 2006), reforçando o conceito de inflamação exacerbada nesta patologia. LOK et al. (2009) determinaram o estado de ativação de leucócitos de gestantes com PE, GN e mulheres NG, avaliando a expressão de mRNA de genes relacionados à inflamação e a concentração de elastase no sangue periférico. Encontraram aumento dos níveis de expressão de mRNA para NF-kB-1A, inibidor de NF-kB, de CDKN-1A, inibidor da cinase dependente de ciclina, genes controladores da inflamação e aumento da concentração de elastase, confirmando a ativação dos leucócitos em pacientes com PE. Em trabalho recente demonstramos aumento da ativação de NF-kB em células mononucleares do sangue periférico de gestantes portadoras de PE, associada a maior produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em comparação com gestantes normotensas (GIORGI et al., 2011). A produção mais elevada de TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$  em gestantes com PE, concorda com resultados anteriores de outros autores (BECKMANN et al., 2004) e sugere que, os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes do TNF- $\alpha$  podem estar associados às manifestações mais graves da PE.

PERAÇOLI et al. (2011) demonstraram a existência de uma correlação positiva entre o aumento da produção da citocina inflamatória TNF- $\alpha$ , de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e nível sérico elevado de ácido úrico na pré-eclâmpsia. O ácido úrico é um dos produtos finais do metabolismo de purinas e várias enzimas estão envolvidas neste processo (MANY et al., 1996). Uma delas é a enzima adenosina deaminase (ADA) responsável pela conversão de adenosina e de desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina, respectivamente (ADAMS & HARKNESS, 1976). Essa enzima é encontrada em tecidos humanos e, apesar de suas funções não estarem completamente elucidadas, a ADA é considerada um indicador de inflamação celular e está intimamente envolvida com a maturação e ativação de células do sistema imune (GALANTI et al., 1981; YONEYAMA et al., 2002). ADA está localizada principalmente em células hematopoiéticas, como células T de perfil Th1, monócitos e macrófagos (KAFSKALI et al., 2006), sendo produzida como resultado de injúria celular ou estresse (UNGERER et al., 1992). Níveis séricos de ADA refletem atividade de monócitos e macrófagos e estão aumentados quando o sistema imune é ativado (HASKÓ & CRONSTEIN, 2004). Assim, linfócitos ou células do sistema monocítico-macrofágico são consideradas responsáveis pelas alterações na atividade de ADA no soro, embora os mecanismos envolvidos não sejam ainda conhecidos (UNGERER et al., 1992; LEE et al., 2007)

Em diversas doenças inflamatórias, como pneumonia (KLOCKARS et al., 1991), tuberculose (LANSAL et al., 2007), artrite reumatóide (PALLINTI et al., 2009), lúpus eritematoso sistêmico (HITOGLOU et al., 2001) e em doenças hepáticas, como cirrose e hepatite (KAYA et al., 2007), a atividade da ADA está aumentada.

Durante a gestação normal há uma diminuição na atividade de ADA sérica comparada a mulheres não-grávidas (OLADIPO et al., 2009). Porém, na PE, devido ao aumento do estado inflamatório materno, a atividade sérica desta enzima tende a se elevar. YONEYAMA et al (2002a) reportaram que a atividade plasmática elevada da ADA na pré-eclâmpsia está associada com mudanças na proporção de células secretoras da citocina IFN- $\gamma$ . Aumento da atividade de ADA no plasma materno e fetal de gestações acometidas por pré-eclâmpsia também foi observado por outros autores (KARABULUT et al., 2005; KAFSKALI et al., 2006). Segundo KAFSKALI et al. (2006) níveis elevados de ADA no plasma materno, no sangue de cordão umbilical e na placenta de gestantes portadoras de PE em comparação a gestantes saudáveis estão associados à presença da doença, mas não à severidade dos

sinais clínicos, uma vez que não observaram diferenças significativas com relação aos níveis de ADA entre gestantes com PE leve ou grave.

Em gestantes portadoras de PE níveis elevados de ácido úrico estão associados à maior produção de ânion superóxido e TNF- $\alpha$  por monócitos, configurando um quadro de reação inflamatória sistêmica (PERAÇOLI et al., 2011). Considerando que a determinação da enzima ADA pode ser utilizada como um marcador bioquímico inflamatório na PE, os resultados do presente projeto poderão trazer importante contribuição para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese das duas formas de PE, precoce e tardia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente projeto teve por objetivo avaliar a concentração plasmática de ADA em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia comparada a gestantes normotensas e mulheres não-grávidas e correlacionar esses valores com a produção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por células mononucleares de sangue periférico.

## **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **3.1 Casuística**

Foram estudadas 30 gestantes saudáveis, normotensas e 60 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, que realizaram a assistência pré-natal e ao parto no Serviço de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Os dois grupos foram pareados pela idade gestacional, a partir de 24 semanas, que foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou por exame ultra-sonográfico precoce (<20 semanas de gestação).

Uma gestante foi considerada portadora de pré-eclâmpsia quando, sem antecedente prévio de hipertensão arterial, apresentou valor de pressão arterial de pelo menos 140x90mmHg e proteinúria ( $\geq$  300mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20<sup>a</sup>. semana de gestação (NHBPEP, 2000).

Como grupo controle foram avaliadas 20 mulheres saudáveis não-grávidas, doadoras voluntárias do Banco de Sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

### **3.2 Critérios de inclusão**

*Grupo com pré-eclâmpsia:* ser primigesta e portadora de pré-eclâmpsia, sem outras complicações clínicas ou obstétricas;

*Grupo de gestantes normotensas:* ser primigesta, com gestação única, sem complicações clínicas ou obstétricas;

*Grupo controle* (mulheres não-grávidas): ser saudável, não-grávida, sem diagnóstico de qualquer patologia obstétrica ou clínica, ter a mesma faixa etária das gestantes e ser doadora voluntária do Banco de Sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP;

### **3.3 Critérios de exclusão**

Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de pré-eclâmpsia ou não ter a gestação resolvida no Serviço de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

### **3.4 Obtenção de plasma e isolamento e cultura de células mononucleares**

Sangue periférico das gestantes e mulheres saudáveis foi colhido por punção venosa e colocado em tubo estéril, contendo 20 U/mL de heparina (Liquemine, Roche). Os tubos foram centrifugados por 10 min a 200 g para a separação dos componentes sanguíneos: plasma, leucócitos e hemácias e plaquetas. O plasma foi aspirado e armazenado a -20°C para posterior dosagem da atividade da enzima Adenosina Deaminase. O halo de leucócitos na interface série vermelha sanguínea e plasma foi aspirado e as células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque, segundo a técnica descrita por Boyum (1968). O anel rico em células mononucleares foi lavado com meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., USA) por 10 min a 200 g duas vezes. Após esses procedimentos as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI suplementado com 2 mM de L-



glutamina (Sigma), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL Life Technologies, Breda, The Netherlands) inativado (RPMI completo), sendo a identificação e a viabilidade dessas células estimadas por incorporação de vermelho neutro. Para isso, as células foram diluídas 10 vezes em vermelho neutro a 0,02% e incubadas durante 10 min a 37°C. A concentração celular foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células viáveis/mL após contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer. Um volume de 1000 µL da suspensão celular foi distribuído em placas de cultura de 24 orifícios (Linbro, Flow Lab, USA) e incubado a 37°C, em tensão de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.5 Obtenção de sobrenadante de cultura de PBMC**

As células mononucleares obtidas conforme descrito no item 3.4 foram incubadas a 37°C, em tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 18h de cultivo, o sobrenadante foi aspirado, submetido à centrifugação e armazenado a - 80°C para posterior dosagem de TNF-α e IL-1β pela técnica de ELISA.

### **3.6 Determinação de citocinas no sobrenadante de PBMC**

A pesquisa das citocinas TNF-α e IL-1β em sobrenadantes de cultura de células mononucleares, estimuladas ou não com 1 µg/mL de LPS, foi realizada pela técnica de ELISA, utilizando-se placas de 96 orifícios de fundo plano (Maxsorb-Nunc, Life Tech. Inc., MD, USA) e anticorpos monoclonais e policlonais anti-citocina específica. As placas foram sensibilizadas por 18h a 5°C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-TNF-α humano ou anti-IL-1β humano (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), diluídos em tampão fosfato pH 7,2 (PBS), na concentração de 2 µg/mL. Após esse período os orifícios foram lavados 4 vezes com 300 µL de PBS, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). O bloqueio da placa foi realizado colocando-se em cada orifício 300 µL de PBS contendo 1% de soro albumina bovina (BSA) à temperatura ambiente por 2 h. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100 µL dos sobrenadantes gerados e das citocinas TNF-α e IL-1β recombinante humano (R & D Systems), em concentrações específicas para cada uma, foram adicionados à placa. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente foi realizada nova lavagem da placa, sendo adicionado o anticorpo revelador policlonal de coelho anti-TNF-α e anti-IL-1β humano conjugados com biotina (R & D Systems) na concentração de 100 ng/mL em PBS contendo 0,1% BSA por um período de 2 h à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada 4 vezes com PBST e

incubada com estreptoavidina conjugada com peroxidase (Sigma), na concentração de 2 ug/mL por 20 min a 37°C. Após lavagem, foi adicionado 100 µL do substrato enzimático, constituído por 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 contendo 1 mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma) e 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (Sigma). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min, a reação bloqueada pela adição de 50 uL de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Multiskan) com comprimento de onda de 492 nm. Os níveis de TNF-α e IL-1β no sobrenadante de cultura mononuclear foram calculados utilizando-se curva padrão obtida com TNF-α e IL-1β recombinante humano (R & D Systems), em concentrações variando de 5 pg/mL a 2000 pg/mL.

### **3.7 Determinação da atividade da adenosina deaminase plasmática**

Para a determinação da atividade da ADA, foram utilizados 5uL de plasma das gestantes e das mulheres não-gravidas. Utilizou-se um aparelho de automação da Johnson & Johnson (modelo Vitros System 5,1/FS) e foi empregado um kit comercial (Genbiotech Diagnostica, Brasil) seguindo-se as instruções do fabricante. O kit, um método colorimétrico não-radioativo, baseia-se na deaminação enzimática de adenosina a inosina que é convertida em hipoxantina pela enzima purina nucleosídeo fosforilase. Hipoxantina é convertida em ácido úrico e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela xantina oxidase. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage com N-etil-N(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metil-anilina (EHSPT) e com 4 amino antipirina (4-AA) na presença de peroxidase e gera o corante quinona, que é quantificado por método colorimétrico. Uma unidade de ADA é definida como a quantidade de ADA necessária para gerar 1 umol de inosina por minuto à 37°C. Os resultados foram expressos em U/L.

### **3.8 Análise Estatística**

Os dados referentes às características das gestantes e mulheres não grávidas foram avaliados empregando-se análise de variância não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis). A comparação entre PE precoce e tardia foi realizada empregando-se o teste U de Mann-Whitney, enquanto a produção de citocinas e a atividade da enzima ADA foram avaliadas por análise de variância paramétrica (ANOVA), segundo o programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego, California. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5% (p < 0,05).

## 4 RESULTADOS

### 4.1. Características das gestantes e mulheres não-grávidas

Na Tabela 1 são apresentadas as características dos três grupos estudados.

Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação aos parâmetros estudados: idade e idade gestacional. Os valores séricos de ácido úrico foram significativamente mais elevados nas gestantes com PE em comparação às normotensas e às mulheres não grávidas. A proteinúria de 24 horas do grupo PE variou de 300 mg a 22520 mg, sendo a mediana no valor de 905 mg.

Parâmetros	Mulheres não-grávidas (NG)	Gestantes normotensas (GN)	Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE)
Idade (anos)	25 (19 - 39)	23 (15 - 39)	26 (13 - 43)
Idade gestacional (semanas)	—	34 (24 - 40)	35 (24 - 40)
Ácido úrico (mg/mL)	2,5 (1,7 - 4,0)	2,9 (2,0 - 3,9)	5,8 * (3,0 - 11,5)
Proteinúria (mg/24h)	negativa	negativa	905 (300 - 22520)

Resultados expressos em mediana (valores mínimo e máximo entre parênteses)

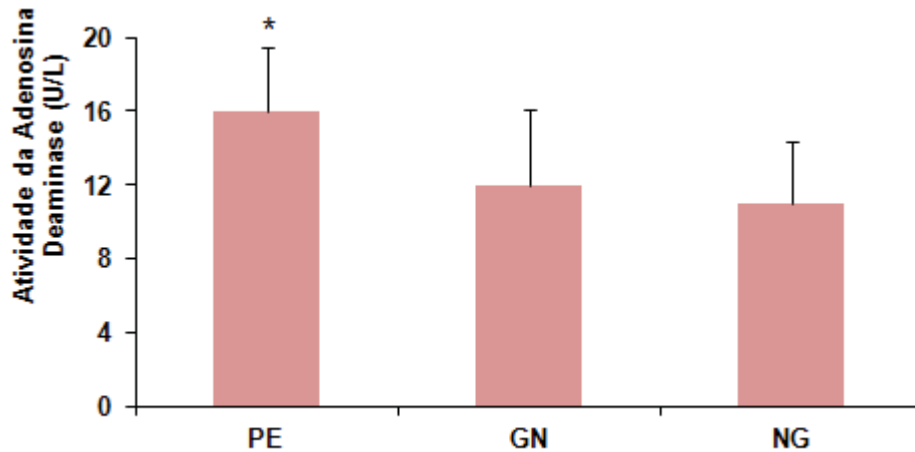
\* (p<0.05) vs NG, GN (Análise de variância não-paramétrica – teste de Kruskal-Wallis)

### 4.2. Determinação da atividade da Adenosina Deaminase

A atividade da enzima adenosina deaminase foi avaliada no plasma das gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas (GN) e mulheres não grávidas (NG). No grupo PE, observou-se aumento da atividade da enzima ADA comparada aos grupos GN e NG. Porém, não houve diferença entre os grupos GN e NG (Figura 1). Subdividindo o grupo PE em pré-eclâmpsia precoce (idade gestacional < 34 semanas) e tardia (idade gestacional ≥ 34 semanas) notou-se que não existe

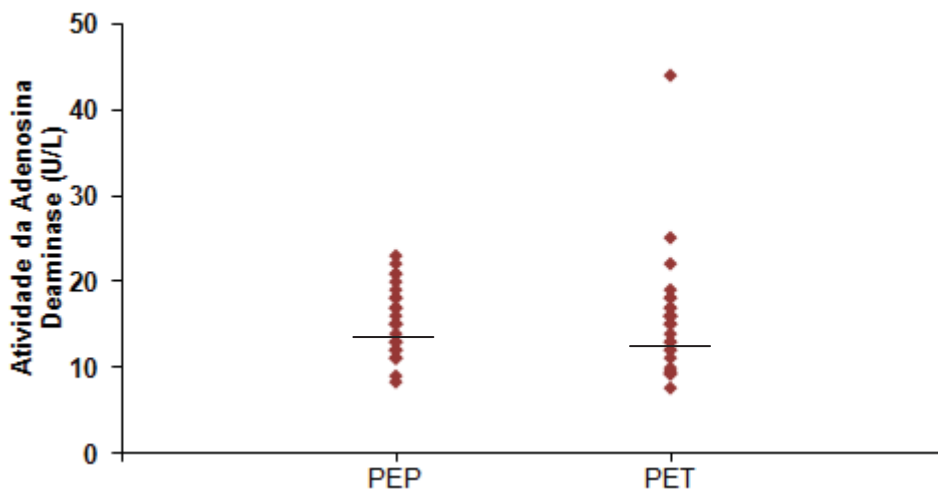
diferença entre os dois grupos com relação à atividade da ADA plasmática (Figura 2).

A análise de correlação entre os níveis plasmáticos de ADA e de ácido úrico em gestantes portadoras de PE mostrou correlação positiva  $r= 0,4082$ ;  $p=0,0024$  entre esses parâmetros. Não se observou correlação entre os valores de ADA e ácido úrico em gestantes normais e em mulheres não grávidas.



**Figura 1.** Atividade da enzima adenosina deaminase (ADA) no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG). Resultados expressos em média  $\pm$  SD.

\*  $p < 0,05$  vs GN e NG (ANOVA)

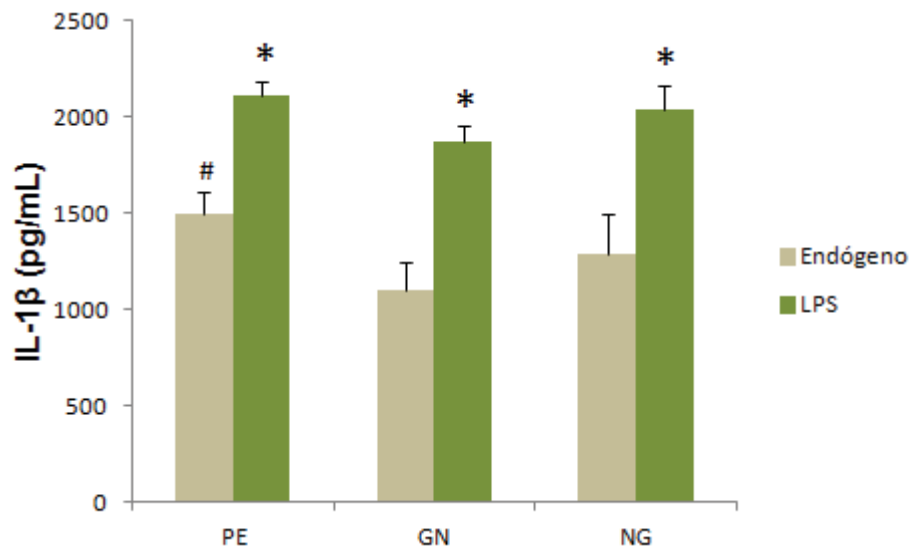


**Figura 2.** Atividade da enzima adenosina deaminase (ADA) no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia precoce (PEP) e pré-eclâmpsia tardia (PET). Resultados expressos em mediana.

### 4.3. Produção de IL-1 $\beta$ por células mononucleares de gestantes normais, portadoras de pré-eclâmpsia e de mulheres não-grávidas

A produção endógena da citocina inflamatória IL-1 $\beta$  por PBMC foi significativamente maior no grupo PE (1598,28 pg/mL  $\pm$  120,87), comparado com o grupo GN (994,95 pg/mL  $\pm$  157,61). Porém, não houve diferença estatística entre os grupos PE e GN quando comparado ao grupo NG (1287,97 pg/mL  $\pm$  214,26) (Figura 3).

O estímulo com LPS também aumentou significativamente a produção de IL-1 $\beta$  em cultura de PBMC de 18 h em comparação às células cultivadas sem estímulo (endógeno) em todos os grupos estudados. Não se observou diferença entre os grupos com relação à capacidade de produção de IL-1 $\beta$  induzida por LPS.

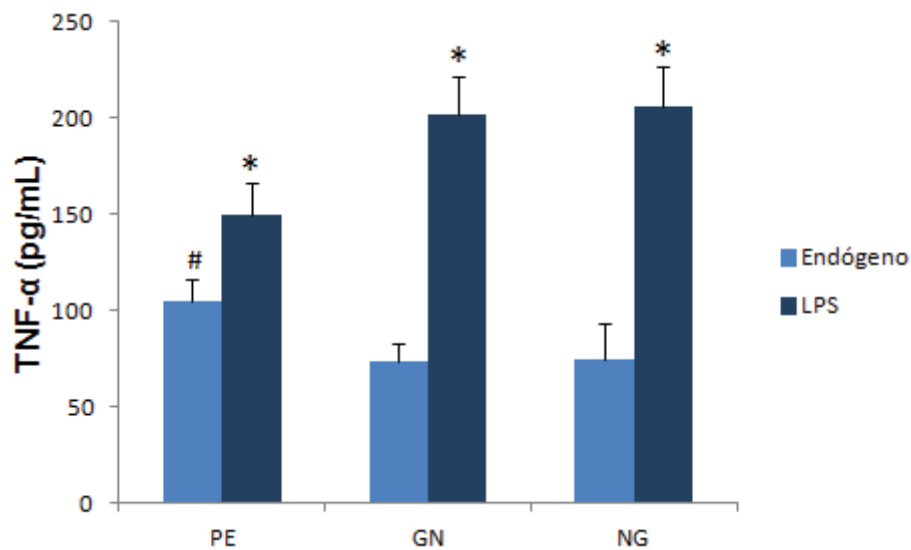


**Figura 3.** Níveis de IL-1 $\beta$  (endógeno e estimulado por LPS) em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG). Os resultados são expressos em média  $\pm$  SD.

\* ( $p < 0,05$ ) vs Endógeno; # ( $p < 0,05$ ) vs GN (ANOVA)

#### 4.4. Produção de TNF- $\alpha$ por células mononucleares de gestantes normais, portadoras de pré-eclâmpsia e de mulheres não-grávidas

A produção endógena da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  foi significativamente maior no grupo PE em comparação aos grupos GN e NG. O estímulo com LPS levou à produção de níveis significativamente mais elevados da citocina em comparação com as células não-estimuladas (produção endógena) em todos os grupos. Entretanto, o grupo PE produziu níveis significativamente menores que os grupos GN e NG.

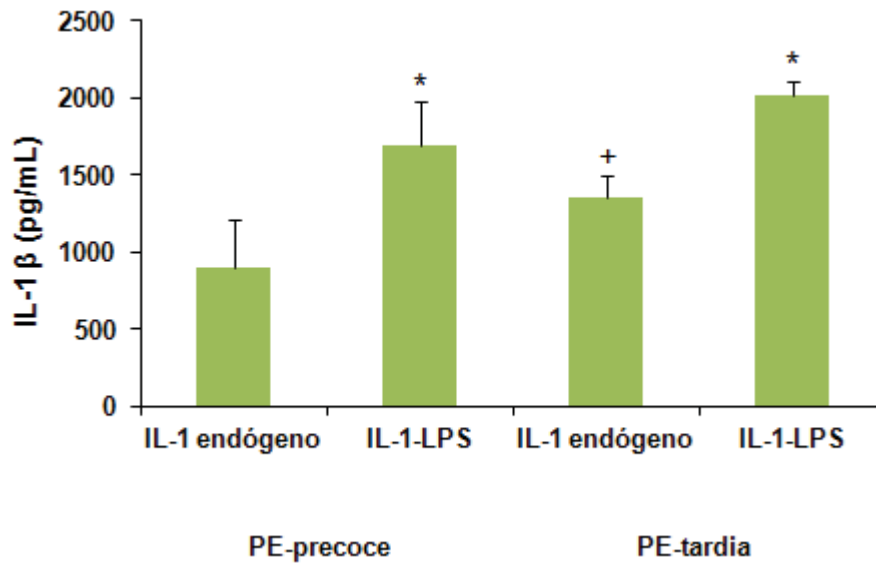


**Figura 4.** Níveis de TNF- $\alpha$  (endógeno e estimulado por LPS) em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG). Os resultados são expressos em média  $\pm$  SD.

\* (p < 0,05) vs Endógeno; # (p < 0,05) vs GN e NG (ANOVA)

#### 4.5. Produção de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ por células mononucleares de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia precoce e tardia

Nas Figuras 5 e 6 estão representados os resultados das concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , respectivamente, produzidas por PBMC de gestantes portadoras de PE, classificadas quanto ao tempo de aparecimento das manifestações clínicas em PE precoce (<34 semanas de gestação) e PE tardia ( $\geq$  34 semanas de gestação).

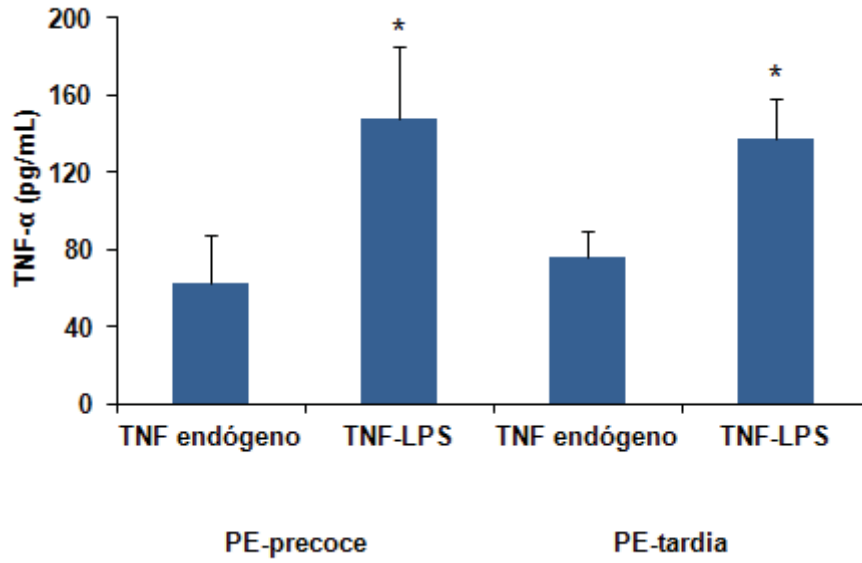


**Figura 5.** Níveis de IL-1 $\beta$  (endógeno e estimulado por LPS ) em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia precoce e tardia. Os resultados são expressos em média  $\pm$  SD.

\* ( $p < 0,05$ ) vs endógeno; + ( $p < 0,05$ ) vs endógeno-PE precoce (ANOVA)

A produção endógena de IL-1  $\beta$  foi significativamente maior no grupo de gestantes com PE tardia em comparação com as gestantes portadoras de PE precoce. O estímulo com LPS induziu a síntese de níveis significativamente mais elevados do que os endógenos e semelhantes nos dois grupos de gestantes hipertensas (Figura 5).

Na Figura 6 observa-se que tanto os níveis endógenos de TNF- $\alpha$  quanto os induzidos por estimulação com LPS foram semelhantes nos dois grupos de gestantes com PE precoce e tardia, não havendo diferença estatística entre eles. A concentração da citocina detectada após estímulo das células com LPS foi significativamente maior do que a produção endógena em cada um dos grupos das gestantes com PE.



**Figura 6.** Níveis de TNF- $\alpha$  (endógeno e estimulado por LPS) em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia precoce e tardia. Os resultados são expressos em média  $\pm$  SD.

\* ( $p < 0,05$ ) vs endógeno



## 5 DISCUSSÃO

A exacerbação do estado inflamatório e a presença de estresse oxidativo na pré-eclâmpsia já estão bem descrito na literatura, sugerindo o envolvimento desses parâmetros na patogênese da doença, apesar dos mecanismos não estarem ainda bem elucidados.

Em nosso trabalho encontramos um aumento da enzima adenosina deaminase (ADA) no plasma de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) em comparação a gestantes normotensas (GN) e mulheres não grávidas (NG). A atividade da ADA está elevada em outras doenças inflamatórias, como pneumonia (KLOCKARS et al., 1991; BLACKBURN et al., 2000), artrite reumatóide (NAKAMACHI et al., 2003; PALLINTI et al.; 2009), tuberculose (GUPTA et al., 2010) e hepatite (KALLKAN et al., 1999; KAYA et al., 2007). A deficiência congênita de ADA causa Imunodeficiência Combinada Severa (SCID), que é caracterizada pela ausência de linfócitos T e B funcionais em indivíduos afetados devido a uma mutação no locus do gene da ADA no cromossomo 20 (FRANCO et al., 1998).

O substrato da ADA, a adenosina, é liberado em locais de injúria e tem o papel de regular possíveis danos e inflamação tecidual através de sua ligação a receptores de superfície presentes em diversas células (MOHSEIN et al., 2007), sendo a ADA responsável por limitar a biodisponibilidade desta substância. Na PE, acredita-se que a placentação inadequada e a baixa perfusão placentária poderiam causar a liberação de fragmentos de membranas do sinciotrofoblasto, DNA fetal e outras substâncias que ativam o sistema imune. A ativação da imunidade celular está intimamente relacionada com o aumento da atividade de ADA em leucócitos (EREL et al., 1998). Na PE é observado o aumento da imunidade celular, especialmente uma maior ativação dos linfócitos T (YONEYAMA et al., 2002a).

Nossos resultados elevados de ADA em gestantes com PE corroboram trabalhos presentes na literatura. YONEYAMA et al. (2002a) correlacionaram o aumento da atividade da ADA plasmática com a proporção de células secretoras da citocina inflamatória IFN- $\gamma$  na PE, focando no estado inflamatório dessa patologia. Já KARABULUT et al. (2005) observaram uma correlação positiva entre ADA e malondialdeído, substância que é um indicador da produção de radicais livres e da peroxidação lipídica.

Em nosso trabalho, encontramos correlação positiva entre a atividade da ADA sérica e os níveis de ácido úrico circulantes. Esse dado reflete a cascata de reação da adenosina que tem como produto final e estável, o ácido úrico. A enzima

ADA catalisa a desaminação de adenosina a inosina que é convertida a hipoxantina através da fosforilase do nucleosídeo purina. A hipoxantina é convertida então em ácido úrico e peróxido de hidrogênio através da xantina oxidase. Assim, a atividade elevada da ADA pode ser considerada uma possível causa da hiperuricemia observada na PE.

A ativação da imunidade celular e o aumento do estado inflamatório na PE também foram comprovados pela maior ativação das células PBMC no grupo PE, analisando a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em sobrenadante de cultura de 18h. A produção de TNF- $\alpha$  foi significativamente mais elevada no grupo PE comparada ao grupo GN e NG. A síntese desta citocina, assim como da IL-1 $\beta$  é regulada, em parte, pelo fator de transcrição nuclear-kB, que está mais ativo em células mononucleares de gestantes com PE (GIORGI et al., 2011). O NF-kB regula a transcrição dos genes relacionados à inflamação (MATSUSAKA et al., 1993; STRIZ et al., 2011) e, o TNF- $\alpha$  por sua vez, age como um estímulo para a ativação do NF-kB, mantendo um ciclo de ativação celular (VALLABHAPURAPU & KARIN, 2009).

O estímulo das células com LPS elevou à produção de TNF- $\alpha$  em todos os grupos estudados, porém, as células das gestantes com PE produziram níveis menores da citocina do que os grupos GN e NG. Considerando que o NF-kB está envolvido na produção de TNF- $\alpha$ , nossos resultados corroboram a idéia de exaustão das células *in vivo* de mulheres com PE, sugerida por BECKMANN et al. (2004). Segundo estes autores, a pré-ativação e exaustão dos leucócitos, expressas pela liberação espontânea elevada de TNF- $\alpha$  poderia levar à menor resposta ao LPS.

A menor capacidade de produção de TNF- $\alpha$  ao estímulo com LPS associada à ativação endógena dos leucócitos de gestantes com PE sugere a instalação de um fenômeno denominado tolerância ao LPS. Essa tolerância à endotoxina foi primeiramente descrita em 1946 por BEESON, como a capacidade reduzida, de animais e humanos (*in vivo*) ou de monócitos e macrófagos cultivados *in vitro*, em responder ao estímulo com LPS após uma exposição prévia a concentrações baixas da endotoxina (FAN et al., 2007; ANEJA et al., 2008). Classicamente, os estudos *in vitro* de tolerância ao LPS empregam baixas doses de LPS para induzir um estado de não-reatividade para o desafio subsequente com concentrações elevadas de LPS (ANEJA et al., 2008). Assim, a tolerância induz um estado transitório de supressão celular, com produção diminuída de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS (VIRCA et al., 1989).

Além da exacerbada resposta inflamatória, outras proteínas intracelulares, como a proteína de choque térmico hsp70, quando presente no compartimento extracelular pode induzir a tolerância ao LPS (ANEJA et al., 2006). Níveis elevados de hsp70 foram descritos no soro de gestantes com PE, sendo associados à inflamação sistêmica e estresse oxidativo, embora não se conheça o papel dessa proteína na fisiopatologia da PE (MOLVAREC et al., 2009).

Níveis elevados de TNF- $\alpha$  têm sido descritos no plasma de gestantes com PE, associados com a patogênese da doença (KUPFERMINC et al., 1994; VINCE et al., 1995; ANIM-NYAME et al., 2003; SHARMA et al., 2007). Outros autores também relatam que existe um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  em placentas de pacientes com PE comparado com placentas de gestantes normais (RINEHART et al., 1999; WANG & WALSH, 1996). Além disso, SEKI et al. (2007) verificaram que na PE, monócitos ativados produzem altos níveis de TNF- $\alpha$  que induzem apoptose e inibem *in vitro*, a proliferação de linhagem de células trofoblásticas de maneira dose-dependente podendo, portanto, ser considerada uma das principais citocinas envolvidas na patogênese da PE.

Já a citocina IL-1 $\beta$  também mostrou-se em níveis mais elevados na pré-eclâmpsia em relação a gestação normal, porém não pareceu estar envolvida com os mecanismos de exaustão celular e tolerância à endotoxina como o TNF- $\alpha$ , pois o estímulo com LPS elevou a produção de IL-1 $\beta$  em todos os grupos, não havendo diferenças entre eles. Este dado nos mostra que os níveis de TNF- $\alpha$  refletem melhor a severidade do estado inflamatório na pré-eclâmpsia do que os de IL-1 $\beta$ , que representa uma citocina secundária na patogênese da pré-eclâmpsia, apesar de seu grande potencial inflamatório. Por outro lado, quando subdividimos o grupo PE em precoce e tardia, encontramos um aumento de IL-1 $\beta$  no grupo PE tardia. Segundo MOLDENHAUER et al. (2003) essas duas subdivisões da pré-eclâmpsia são entidades diferentes. Ou seja, a pré-eclâmpsia precoce decorre de anomalia da remodelação vascular placentária, sem alterações primárias do sistema vascular materno e corresponde a um defeito da invasão das células citotrofoblásticas nas arteríolas espiraladas. E a pré-eclâmpsia tardia resulta da interação entre uma placenta normal e alteração inicial da rede vascular materna. Esta vasculopatia materna é favorecida por fatores de risco vascular inespecíficos como diabetes, idade, hipertensão arterial e índice de massa corpóreo aumentado. Representa um obstáculo ao desenvolvimento da vascularização, observado fisiologicamente no

final da gestação, em resposta a importantes necessidades hemodinâmicas fetoplacentárias (BOULANGER & FLAMANT, 2007). Provavelmente, a IL-1 $\beta$  esteja relacionada com possíveis disfunções metabólicas e vasculopatia presentes nas gestantes que desenvolvem pré-eclâmpsia após a 34<sup>a</sup> semana, e não, com a inadequada placentação.

Em nosso trabalho, a produção elevada de IL-1 $\beta$  por PBMC de gestantes com PE corroboram os resultados observados na literatura. KALINDERIS et. al. (2011) notaram um significativo aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  sérico em pacientes com pré-eclâmpsia comparado às gestantes normotensas. Na placenta, RINEHART et. al. (1999) reportaram um aumento da expressão de IL-1 $\beta$  e, LUPPI et al. (2006) observaram uma produção endógena elevada de IL-6 e IL-1 $\beta$  por monócitos de gestantes com PE.

A IL-1 $\beta$  é uma importante citocina iniciadora da resposta inflamatória aguda a infecções (DINARELLO, 1996) e mais recentemente descobriu-se que ela apresenta um papel crucial no estabelecimento da resposta Th17 (CHUNG et al., 2009). Além do desequilíbrio Th1/Th2, alterações na prevalência de células Th17 e células T reguladoras tem sido sugeridas contribuir com a inflamação na PE (SANTNER-NANAN et al., 2009). As células T precursoras, na dependência do ambiente de citocinas presente, se diferenciam em células Th1 envolvidas na imunidade celular, em células Th2 envolvidas na imunidade humoral e ativação de eosinófilos, em células Th17 que protegem contra infecções fúngicas e medeiam diferentes tipos de inflamação tecidual e, células T reguladoras (Treg) que são importantes na manutenção da auto-tolerância e regulam a inflamação (SAITO et al, 2010).

Na gestação normal, SANTNER-NANAN et al (2009) observaram um aumento de populações de células Treg circulantes no sangue em comparação com mulheres não grávidas, justificando que este subtipo celular seria importante na tolerância ao antígeno paterno presente no embrião. Porém, na PE os autores reportaram uma proporção diminuída de células Treg circulantes, semelhante a observada em mulheres não grávidas. A diminuição de células Treg e o aumento de células Th17 foram observados em sangue periférico de gestantes com PE comparando-se a gestantes normais e mulheres não grávidas. O aumento de células Th17 circulantes na pré-eclâmpsia também foi observado por JIANJUN et al. (2009), que também reportaram diminuição da expressão de Foxp3 (fator de transcrição

típico de células Treg) e aumento da expressão de RORc (fator de transcrição típico de células Th17) na decídua e nas células PBMC de mulheres pré-eclâmpicas.

Alguns estudos têm mostrado a existência de um elo na diferenciação de células T precursoras para células Treg e células Th17 (WEAVER & HATTON, 2009; PECK & MELLINS, 2009). Ambos os subtipos celulares necessitam de TGF- $\beta$  para se diferenciarem. Um ambiente contendo apenas TGF- $\beta$  é suficiente para originar o subtipo Treg. Entretanto, para gerar células Th17, além de TGF- $\beta$  é necessária a presença de IL-6 e/ou IL-1 $\beta$ . Alguns estudos reportam que o TGF- $\beta$  inibe a geração de células Th17 e, que portando a presença de IL-1 e IL-6 além de TGF- $\beta$ , são essenciais para a geração do perfil Th17 (ACOSTA-RODRIGUEZ et al, 2007; WILSON et al., 2007). A endoglina solúvel, receptor de TGF- $\beta$ , apresenta níveis elevados na gestação, anteriormente, ao aparecimento do quadro de PE, resultando em angiogênese deficiente (LEVINE et al., 2006) e, possivelmente, inibe a diferenciação de células Treg na PE (SAITO, 2010).

O desequilíbrio entre células Treg e células Th17 pode ser ainda mais intensificado devido à plasticidade das células Treg, demonstrada em humanos e em camundongos (AFZALI et al, 2009). Assim, as células Treg perdem sua função supressora e são reprogramadas ao fenótipo Th17 na presença de TGF- $\beta$  e IL-6 (VELDHOEN et al., 2006; XU et al., 2007) ou apenas na presença de IL-6 (KITANI & XU, 2008). Portanto, na PE, o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 devem favorecer a geração de células Th17 tanto a partir de células precursoras quanto a partir de células Treg. SAITO (2010) sugere que o aumento de células Th17 deve levar a um estado inflamatório crônico e promover hipertensão e disfunção endotelial em mulheres com PE.

A elevada produção de IL-1 $\beta$  na pré-eclâmpsia também pode estar relacionada com a hiperuricemia encontrada nas pacientes deste grupo. A ligação de LPS, ácido lipoteicóico, flagelina, cristais de ácido úrico, entre outros PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos) ativa receptores como Nod-like (NLR) (receptor citoplasmático) responsável pela ativação do inflamassomo (LAMKANFI et al., 2007). O inflamassomo é um complexo citosólico multiprotéico formado por proteínas NALP conectada a caspase-1 através da proteína adaptadora ASC e é responsável pelo processamento e ativação da IL-1 $\beta$  e IL-18 (PÉTRILLI et al., 2007). A pró-IL-1 $\beta$  é clivada por caspase-1 resultando na geração de IL-1 $\beta$  biologicamente ativa que,

subsequentemente, é secretada no meio extracelular (EDER, 2009). Em trabalho recente, CONFORTI-ANDREONI et al. (2011) reportaram a importância do ácido úrico juntamente com a via de sinalização do NF- $\kappa$ B na ativação do inflamassomo em células dendríticas, produção de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e diferenciação para o perfil Th17.

Portanto, a partir deste trabalho podemos concluir que na PE, os elevados níveis plasmáticos de ADA refletem o estado de ativação do sistema imune, principalmente da imunidade celular, representada pelo aumento dos níveis endógenos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , produzidos por linfócitos e monócitos ativados *in vivo*. A associação entre níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, da concentração plasmática de ADA e hiperuricemia sugere que essa enzima pode ser considerada um marcador de inflamação celular na PE.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). Committee on Obstetric Practice. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.*, v. 77, p. 67–75, 2002.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.*, v. 9, p. 942-949, 2007.
- ADAMS, A.; HARKNESS, R. A. Adenosine deaminase activity in thymus and human tissues. *Clin Exp Immunol.*, v. 26, p. 647–649, 1976.
- AFZALI, B.; MITCHELL, P.; LECHLER, R. I.; JOHN, S.; LOMBARDI, G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.*, v. 159, p. 120–130, 2009.
- ANEJA, R.; ODOMS, K.; DUNSMORE, K.; SHANLEY, T. P.; WONG, H. R. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J Immunol.* v. 177, p. 7184-7192, 2006.
- ANEJA, R. K.; TSUNG, A.; SJODIN, H.; GEFTER, J. V.; DELUDE, R. L.; BILLIAR, T. R.; FINK, M. P. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance. *J Leukoc Biol.* v. 84, p. 1326-1334, 2008.
- ANIM-NYAME, N.; GAMBLE, J.; SOORANNA, S. R.; JOHNSON, M. R.; STEER, P. J. Microvascular permeability is related to circulating levels of tumor necrosis factor-alpha in pre-eclampsia. *Cardiovasc Res.* v. 58, p. 162-169, 2003.
- BEESON, P. B. Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. *Proc Soc Exp Biol Med.* v. 61, p. 248-250, 1946.
- BECKMANN, I.; EFRAIM, S. B.; VERVOORT, M.; VISSER, W.; WALLENBURG, H.C. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. *Hypertens Pregnancy.* v. 23, p. 319-329, 2004.

- BLACKBURN, M. R.; VOLMER, J. B.; THRASHER, J. L.; ZHONG, H.; CROSBY, J. R.; LEE, J. J.; KELLEMS, R. E. Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. *J Exp Med*., v. 192, p. 159–170, 2000.
- BORZYCHOWSKI, A. M.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.*, v. 11, p. 309-316, 2006.
- BOULANGER, H.; FLAMANT, M. New insights in the pathophysiology of preeclampsia and potential therapeutic implications. *Nephrol Ther.*, v. 7, p. 437 – 448, 2007.
- BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, v. 97, p. 77-89, 1968.
- CHUNG, Y.; CHANG, S. H.; MARTINEZ, G. J.; YANG, X. O.; NURIEVA, R.; et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.*, v. 30, p. 576–587, 2009.
- CONFORTI-ANDREONI, C.; SPREAFICO, R.; QIAN, H. L.; RITEAU, N.; RYFFEL, B.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; MORTELLARO, A. Uric acid – driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. *J Immunol.*, v. 187, p. 5842 – 5850, 2011.
- DEKKER, G. A.; SIBAI, B. M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia. Current concepts. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 179, p. 1359-1375, 1998.
- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.*, v. 87, p. 2095–2147, 1996.
- EDER, C. Mechanisms of interleukin-1 $\beta$  release. *Immunobiology.* v. 214, p. 543-553, 2009.
- EREL, O.; KOCYIGIT, A.; GUREL, M. S.; BULUT, V.; SEYREK, A.; OZDEMIR, Y. Adenosine deaminase activities in sera, lymphocytes and granulocytes in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 491 – 494, 1998.
- FAN, H.; WILLIAMS, D. L.; ZINGARELLI, B.; BREUEL, K. F.; TETI, G.; TEMPEL, G. E.; SPICHER, K.; BOULAY, G.; BIRNBAUMER, L.; HALUSHKA, P. V.; COOK,



- J. A. Differential regulation of lipopolysaccharide and Gram-positive bacteria induced cytokine and chemokine production in macrophages by Galpha(i) proteins. *Immunology.*, v. 122, p. 116-123, 2007.
- FRANCO, R.; VALENZUELA, A.; LLUIS, C.; BLANCO, J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev.*, v.161, p. 27 – 42, 1998.
- GALANTI, S.; NARDIELLO, M.; RUSSO, F.; FIORENTINO. Increased lymphocyte adenosine deaminase in typhoid fever. *Scand J Infect Dis.*, v. 13, p. 47–50, 1981.
- GIORGI, V. S. I.; BANNWART-CASTRO, C. F.; PERAÇOLI, J. C.; PERAÇOLI, M. T. S. Efeito da silibinina sobre o fator de transcrição nuclear-kB e produção de citocinas inflamatórias por células mononucleares de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biomédicas) – Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu, 2011.
- GUPTA, B. K.; BHARAT, V.; BANDYOPADHYAY, D. Role os adenosine deaminase estimation in differentiation of tuberculous and non-tuberculous exudative pleural effusions. *J Clin Med Res.*, v. 2, p. 79 – 84, 2010.
- HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.*, v. 25, p. 33-39, 2004.
- HITOGLOU, S.; HATZISTILIANOU, M.; GOUGOUSTAMOU, D.; ATHANASSIADOU, F.; KOTSIS, A.; CATRIU, D. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.*, v. 20, p. 411–416, 2001.
- HUPPERTZ, B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension.* v. 51, p. 970-975, 2008.
- IRGENS, H. U.; REISAETER, L.; IRGENS, L. M.; LIE, R. T. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *Brit Med J*, v. 323, p. 1213 – 1217, 2001.
- JIANJUN, Z.; YALI, H.; ZHIQUN, W.; MINGMING, Z.; XIA, Z. Imbalance of T-cell transcription factors contributes to the Th1 type immunity predominant in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, v. 63, p. 38–45, 2009.

- KAFSKALI, A.; KARABULUT, A. B.; ATMACA, R.; LAURINI, R. Clinical correlation between adenosine deaminase activity and pré-eclampsia severity. *J Inter Med Res*, v. 34, p. 247-255, 2006.
- KALINDERIS, M.; PAPANIKOLAOU, A.; KALINDERI, K.; IOANNIDOU, E.; GIANNOULIS, C.; KARAGIANNIS, V.; TARLATZIS, B. C. Elevated Serum Levels of Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$  and Human Chorionic Gonadotropin in Pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* v. 65, p. 1-8, 2011.
- KALLKAN, A.; BULT, V.; EREL, O.; AVCI, S.; BINGOL, N. K. Adenosine deaminase and guanosine deaminase activities in sera of patients with viral hepatitis. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 383–386, 1999.
- KARABULUT, A. B.; KAFKASLI, A.; BURAK, F.; GOZUKARA, E. M. Maternal and fetal plasma adenosine deaminase, xanthine oxidase and malondialdehyde levels in pré-eclampsia. *Cell Biochem Funct.*, v. 23, p. 279-283, 2005.
- KAYA, S.; CETIN, E. S.; ARIDOGAN, B. C.; ARIKAN, S.; DEMIRCI, M. Adenosine deaminase activity in serum of patients with hepatitis – a useful tool in monitoring clinical status. *J Microbiol Immunol Infect.*, v. 40, p. 288-92, 2007.
- KITANI, A.; XU, L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunol.*, v. 1, p. 43 – 46, 2008.
- KLOCKARS, M.; KLEEMOLA, M.; LEINONEN, M.; KOSKELA, M. 1991. Serum adenosine deaminase in viral and bacterial pneumonia. *Chest.*, v. 99, p. 623-626, 1991.
- KUPFERMINC, M. J.; PEACEMAN, A. M.; WIGTON, T. R.; TAMURA, R. K.; REHNBERG, K. A.; SOCOL, M. L. Immunoreactive tumor necrosis factor-alpha is elevated in maternal plasma but undetected in amniotic fluid in the second trimester. *Am J Obstet Gynecol.* v. 171, p. 976-979, 1994.
- LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. D.; FRANCHI, L.; NÚÑEZ, G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.*, v. 2, p. 220 – 225, 2007.
- LANSAL, M.; GAUTAM, N.; BHATTA, N.; MAJHI, S.; BARAL, N.; BHATTACHARYA, S. K. Diagnostic utility of adenosine deaminase (ADA) activity in pleural fluid and serum of tuberculous and non-tuberculous respiratory disease patients. *South Asian J Trop Med Public Health*, v. 38, p. 363-369, 2007.

- LEE, S. J.; HWANG, H. S.; KIM, B. N. R.; KIM, M. A.; LEE, J. W.; PARK, Y. W.; KIM, Y. H. Changes in serum adenosine deaminase activity during normal pregnancy. *J Korean Med Sci.*, v. 22, p. 718-721, 2007.
- LEVINE, R. J.; LAM, C.; QIAN, C.; YU, K. F.; MAYNARD, S. E.; SACHS, B. P. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.*, v. 355, p. 992–1005, 2006.
- LOK, C. A.; JEBBINK, J.; NIEUWLAND, R.; FAAS, M. M.; BOER, K.; STURK, A.; VAN DER POST, J. A. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.*, v. 61, p. 346-359, 2009.
- LUPPI, P.; DELOIA, J. A. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.*, v. 118, p. 268-275, 2006.
- LUPPI, P.; TSE, H.; LAIN, K. Y.; MARKOVIC, N.; PIGANELLI, J. D.; DELOIA, J. A. Preeclampsia activates circulating immune cells with engagement of NF- $\kappa$ B pathway. *Am J Reprod Immunol*, v. 56, p. 135-144, 2006.
- MANY, A.; HUBEL, C. A.; ROBERTS, J. M. Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *Am J Obstet Gynecol*, v. 174, p. 288–291, 1996.
- MATSUSAKA, T.; FUJIKAWA, K.; NISHIO, Y.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 90, p. 10193-10197, 1993.
- MOHSENIN, A.; MI, T.; XIA, Y.; KELLEMS, R. E.; CHEN, J. F.; BLACKBURN, M. R. Genetic removal of the A<sub>2A</sub> adenosine receptor enhances pulmonary inflammation, mucin production, and angiogenesis in adenosine deaminase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* v. 293, p. L753-L761, 2007.
- MOLDENHAUER, J. S.; STANEK, J.; WARSHAK, C.; KHOURY, J.; SIBAI, B. The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 4, p. 1173 – 1177, 2003.
- MOLVAREC, A.; DERZSY, Z.; KOCSIS, J.; BOZE, T.; NAGY, B.; BALOGH, K.; MAKÓ, V.; CERVENAK, L.; MÉZES, M.; KARÁDI, I.; PROHÁSZKA, Z.; RIGÓ, J. Circulating anti-heat-shock-protein antibodies in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Stress Chaperones*. v. 14, p. 491-498, 2009.

- MURPHY, D. J.; STIRRAT, G. M. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.*, v. 19, p. 221 – 231, 2000.
- NAKAMACHI, Y.; KOSHIBA, M.; NAKAZAWA, T.; HATACHI, S.; SAURA, R.; KUROSAKA, M.; KUSAKA, H.; KUMAGAI, S. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheum*, v. 48, p. 668 – 674, 2003.
- NESS, R. B.; SIBAI, B. M. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 195, p. 40 – 49, 2006.
- NHBPEP. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* v. 183, p. 1-22, 2000.
- OLADIPO, O. O.; AFOLABI, B. B.; OKORODUDU, A. O. Adenosine deaminase activity in subjects with normal pregnancy, pregnancy induced hypertension and pre-eclampsia. *West Afr J Med.*, v. 28, p. 161-164, 2009.
- PALLINTI, V.; GANESAN, N.; ANBAZHAGAN, M.; RAJASEKHAR, G. Serum biochemical markers in rheumatoid arthritis. *Indian J Biochem Biophys*, v. 46, p. 342–344, 2009.
- PECK, A.; MELLINS, E. D. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology*, v. 129, p. 147–153, 2009.
- PERAÇOLI, J. C.; RUDGE, M. V.; PERAÇOLI, M. T. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.*, v. 57, p. 177-185, 2007.
- PERAÇOLI, M. T.; MENEGON, F. T.; BORGES, V. T.; DE ARAÚJO COSTA, R. A.; THOMAZINI-SANTOS, I. A.; PERAÇOLI, J. C. Platelet aggregation and TGF-beta(1) plasma levels in pregnant women with preeclampsia. *J Reprod Immunol.*, v. 79, p. 79-84, 2008.

- PERAÇOLI, M. T.; BANNWART, C. F.; CRISTOFALO, R.; MEDEIROS BORGES, V. T.; ARAÚJO COSTA, R. A.; WITKIN, S. S.; PERAÇOLI, J. C. Increased Reactive Oxygen Species and Tumor Necrosis Factor-Alpha Production by Monocytes are Associated with Elevated Levels of Uric Acid in Pre-Eclamptic Women. *Am J Reprod Immunol.*, v. 66, p. 460-467.
- PÉTRILLI, V.; PAPIN, S.; DOSTERT, C.; MAYOR, A.; MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Activation of the NALP-3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Different.*, v. 14, p. 1583–1589, 2007.
- REDMAN, C. W.; SACKS, G. P.; SARGENT, I. L. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 180, p. 499-506, 1999.
- REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta*, v. 24, p. S21-S27, 2003.
- REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, v. 308, p. 1592–1594, 2005.
- RINEHART, B. K.; TERRONE, D. A.; LAGOO-DEENADAYALAN, S.; BARBER, W. H.; HALE, E. A.; MARTIN, J. N. JR.; BENNETT, W. A. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* v. 181, p. 915–920, 1999.
- ROBILLARD, P. Y.; DEKKER, G.; CHAOUAT, G.; HULSEY, T. C.; SAFTLAS, A. Epidemiological studies on primipaternity and immunology in preeclampsia – a statement after twelve years of workshops. *J Reprod Immunol*, v. 89, p. 104–117, 2011.
- SAITO, S.; SHIOZAKI, A.; NAKASHIMA, A.; SAKAI, M.; SASAKI, Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med.*, v. 28, p. 192-209, 2007.
- SAITO, S.; NAKASHIMA, A.; SHIMA, T.; ITO, M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.*, v. 63, p. 601 – 610, 2010.
- SANTNER-NANAN, B.; PEEK, M. J.; KHANAM, R.; RICHARTS, L.; ZHU, E.; FAZEKAS DE ST GROTH, B. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol.*, v. 183, p. 7023–7030, 2009.

- SEKI, H.; MATUOKA, K.; INOOKU, H.; TAKEDA, S. TNF-alpha from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line. *J Obstet Gynaecol Res.* v. 33, p.408-416, 2007.
- SHARMA, A.; SATYAM, A.; SHARMA, J. B. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol.* v. 58, p. 21-30, 2007.
- SIBAI, B. M.; WL-NAZER, A.; GONZALEZ-RUIZ, A. Severe preeclampsia-eclampsia in Young primigravid women: subsequent pregnancy outcome and remote prognosis. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 155, p. 1011 – 1006, 1986.
- SIBAI, B. M. Management of preeclampsia. *Clin Perinatol.*, v. 18, p. 793 – 808, 1991.
- SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. *Lancet*, v. 365, p. 785 – 799, 2005.
- SMITH, G. C.; Pregnancy complication and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet*, v. 357, p. 2002 – 2006, 2001.
- STRIZ, I.; BRABCOVA, E.; KOLESAR, L.; LIU, X. D.; BRABCOVA, I.; SEKERKOVA, A.; POOLE, J. A.; JARESOVA, M.; SLAVCEV, A.; RENNARD, S. I. Epithelial cells modulate genes associated with NF kappa B activation in co-cultured human macrophages. *Immunobiology*, 2011.
- TROGSTAD, L.; MAGNUS, P.; STOLTENBERG, C. Pre-eclampsia: risk factor and causal models. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, v. 25, p. 329-342, 2011.
- UNAL, E. R.; ROBINSON, C. J.; JOHNSON, D. D.; CHANG, E. Y.. Second-trimester angiogenic factors as biomarkers for future-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 197, p. 211-214, 2007.
- UNGERER, J. P.; OOSTHUIZEN, H. M.; BISSBORT, S. H.; VERMAAK, W. J. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clin Chem.*, v. 38, p. 1322-1326, 1992.
- VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27:693-733, 2009.
- VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu

- supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.*, v. 24, p. 179–89, 2006.
- VINCE, G. S.; STARKEY, P. M.; AUSTGULEN, R.; KWIATKOWSKI, D.; REDMAN, C. W. G. Interleukin-6, tumor necrosis factor and soluble tumor necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* v. 102, p. 20-25, 1995.
- VIRCA, G. D.; KIM, S. Y.; GLASER, K. B.; ULEVITCH, R. J. Lipopolysaccharide induces hyporesponsiveness to its own action in RAW 264.7 cells. *J Biol Chem.* v. 264, p. 21951-21956, 1989.
- VISSER, N.; VAN RIJN, B. B.; RIJKERS, G. T.; FRANX, A.; BRUINSE, H. W. Inflammatory changes in preeclampsia: current understanding of the maternal innate and adaptive immune response. *Obstet Gynecol Surv.*, v. 62, p. 191-201, 2007.
- VON DADELSZEN, P.; MAGEE, L. A.; ROBERTS, J. M. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* v. 22, p.143–148, 2003.
- WANG, Y.; WALSH, S. W. TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. *J Reprod Immunol.* v.32, p.157-169, 1996.
- WEAVER, C. T.; HATTON, R. D. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol.*, v. 9, p. 883–889, 2009.
- WILSON, N. J.; BONIFACE, K.; CHAN, J. R.; MCKENZIE, B. S.; BLUMENSCHN, W. M.; MATTSON, J. D.; BASHAM, B.; SMITH, K.; CHEN, T.; MOREL, F.; LECRON, J. C.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J.; MCCLANAHAN, T. K.; BOWMAN, E. P.; DE WAAL MALEFTY, R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.*, v. 9, p. 950 – 957, 2007.
- XU, L.; KITANI, A.; FUSS, I.; STROBER, W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol.*, v. 178, p. 6725–6729, 2007.
- YONEYAMA, Y.; SAWA, R.; SUZUKI, S.; MIURA, A.; KOBAYASHI, H.; DOI, D.; YONEYAMA, K.; ARAKI, T. Relation between adenosine deaminase activities

and cytokine-producing T cells in women with preeclampsia. *Clin Biochem*, v. 35, p. 303-306, 2002a.

YONEYAMA, Y.; SAWA, R.; SUZUKI, S.; OTSUBO, Y.; ARAKI, T. Serum adenosine deaminase activity in women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chim Acta.*, v. 324, p. 141–145, 2002.