

Vanessa Silvestre Innocenti Giorgi

Efeito da silibinina sobre o fator de transcrição nuclear- κ B e produção de citocinas inflamatórias por células mononucleares de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Co-orientadora: Dr^a Camila Ferreira Bannwart Castro

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO*

Giorgi, Vanessa Silvestre Innocenti.

Efeito da silibinina sobre o fator de transcrição nuclear-kB e produção de citocinas inflamatórias por células mononucleares de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Vanessa Silvestre Innocenti Giorgi. - Botucatu, 2011.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Coorientadora: Camila Ferreira Bannwart Castro

Capes: 21104000

1. Pré-eclâmpsia. 2. Farmacologia obstétrica.

Palavras-chave: IL-1 β ; NF-kB; Pré-eclâmpsia; Silibinina; TNF- α .

Aos meus pais, Fábio e Ivone.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à minha querida professora Maria Terezinha Serrão Peraçoli pela oportunidade e confiança, e por todos ensinamentos, orientações, conselhos, apoio e auxílio em minha vida acadêmica e pessoal. Agradeço por tornar a Imunologia muito mais interessante e compreensível e me mostrar como fazer Ciência e pesquisa. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão e a minha imensa admiração.

À minha co-orientadora e amiga, Camila, por toda a paciência em me ensinar e por me incentivar perante todas as incertezas, sempre com muito carinho.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório (“Lab 3”) por proporcionarem um ambiente de trabalho incrível e por tornarem meus dias muito mais iluminados. Pela atenção, paciência e ensinamentos. Érika, Ingrid, Leonardo, Mariana e Vanessa, muito obrigada!

À FAPESP, por todo suporte financeiro fornecido para este projeto.

A todos docentes, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por todos os auxílios e pela boa convivência.

À turma de Biomedicina XLIV e às comissões organizadoras do 12º, 13º e 14º ENBM por tornarem minha graduação muito mais proveitosa e divertida. Em especial, agradeço Borra, Eto, Fer, Helo, Hip`s, Meião, Pekúnia, Piru, Serosa e Zulu, meus inesquecíveis amigos da XLIV.

Às minhas amigas Marila, Natália, Tânia, Karina e Aninha pelo incentivo, motivação e risadas nos finais de semana.

À minha avó, Edméa, por todas as orações e incentivo.

À minha madrinha, Tia Lu, pelos conselhos e elogios.

Ao meu namorado, Thiago, por sua enorme paciência e por talentosamente ser um bom ouvinte. Obrigada pelas horas de desabafo, pelo apoio, pelas boas idéias e por todo carinho.

À minha família, por ser a minha base, o meu alicerce, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as decisões. Agradeço às minha irmãs, Anna Paula e Bruna, por todos conselhos, broncas, telefonemas e risadas e, por me mostrarem o sentido da palavra união. Não posso esquecer da minha cachorrinha lala que sempre me “desestressou” nos momentos de tensão. E por último, mas não menos importante, aos meus pais por me ensinarem o sentido da vida, por me darem todo o amor e suporte necessário e, por sempre me permitirem sonhar, com os pés no chão.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”

- Louis Pasteur-

Resumo

A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação da gestação humana caracterizada por hipertensão arterial e proteinúria após a 20ª semana de gestação. Sua incidência varia de 5% a 7% das gestações e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna e fetal. Esta é uma doença multissistêmica, centralizada na disfunção vascular e está intimamente relacionada com a ativação exacerbada do sistema imunológico. Além do aumento da ativação de monócitos e granulócitos, existe uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias nas gestantes com PE. O fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB) está presente nas células do sistema imune e é responsável pela transcrição de genes relacionados com a inflamação. Considerando que a PE está associada à resposta inflamatória intensa e generalizada, o emprego de substâncias moduladoras da atividade do fator NF-kB poderia ser útil para atenuar a inflamação presente nessas pacientes. A silibinina é o principal componente da silimarina, um extrato polifenólico obtido de frutos e sementes de *Silybum marianum*, com potente atividade hepatoprotetora, anti-inflamatória e anti-fibrótica. Tem como um dos mecanismos de ação a capacidade de inibir a ativação do fator NF-kB e, conseqüentemente, sua migração para o núcleo. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a silibinina modula a atividade de NF-kB e a produção de citocinas inflamatórias em células mononucleares de pacientes com PE. Foram avaliadas 34 gestantes com PE, 20 gestantes normotensas (GN) e 15 mulheres não grávidas (NG). Células mononucleares (PBMC) foram obtidas do sangue periférico e cultivadas na presença ou ausência de silibinina (5 uM ou 50 uM) e estimuladas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) por 18 h para a obtenção de sobrenadante e subsequente determinação da concentração do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1 β) por ensaio imunoenzimático (ELISA). As células foram também cultivadas por 30 min para a realização da extração nuclear e determinação da atividade de NF-kB. Os resultados mostraram aumento da ativação de NF-kB em PBMC dos grupos PE e NG comparados ao grupo GN; porém não houve diferença estatisticamente significativa entre NG e PE. Observou-se também aumento na produção de TNF- α e IL-1 β , por PBMC do grupo PE comparado ao grupo GN. A silibinina na concentração de 50 uM apresentou atividade anti-inflamatória, inibindo a ativação de NF-kB e a produção das citocinas inflamatórias em todos os grupos estudados. Portanto,

pacientes com PE apresentaram uma maior ativação de PBMC em comparação GN e, a silibinina apresentou atividade moduladora sobre a resposta inflamatória, sugerindo sua utilização como terapêutica adjuvante na pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia; NF-kB; TNF- α ; IL-1 β ; Silibinina.

Abstract

Pre-eclampsia (PE) is a complication of human pregnancy characterized by hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation. Its incidence varies from 5% to 7% of pregnancies and is a major cause of morbidity and maternal and fetal mortality. This is a multisystemic disease, with focus on vascular dysfunction and is closely related to the exacerbated activation of the immune system. In addition to increased activation of monocytes and granulocytes, there is an elevated production of proinflammatory cytokines in pregnant women with PE. The nuclear transcription factor-kB (NF-kB) is present in the cells of the immune system and is responsible for transcription of genes related to inflammation. Whereas the PE is associated with intense inflammatory response, the use of substances modulating the activity of NF-kB factor could be useful in alleviating the inflammation present in these patients. Silibinin is the main component of silymarin, a polyphenolic extract obtained from fruits and seeds of *Silybum marianum* with potent hepatoprotective, anti-inflammatory and anti-fibrotic activities. The silibinin mechanism of action includes the ability to inhibit NF-kB activation and, consequently, its migration to the nucleus. The objective of this study was to assess whether silibinin modulates the activity of NF-kB and the production of inflammatory cytokines in mononuclear cells of patients with PE. We evaluated 34 pregnant women with PE, 20 normotensive pregnant women (GN) and 15 non-pregnant women (NG). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from those groups of women and cultured in the presence or absence of silibinin (5 μ M or 50 μ M) and stimulated or not with lipopolysaccharide (LPS) for 18 h to obtain supernatant for determination of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1 β) by enzyme immunoassay (ELISA). The cells were also cultured for 30 min to perform the extraction and determination of the nuclear activity of NF-kB. The results showed increased activation of NF-kB in PBMC of the PE and NG groups compared to the GN group, but there was no statistically significant difference between NG and PE. We also observed increased production of TNF- α and IL-1 β by PBMC in the PE group compared to GN group. Silibinin at concentration of 50 μ M showed an anti-inflammatory activity, inhibiting the activation of NF-kB and production of inflammatory cytokines in all the groups studied. Therefore, patients with PE showed a greater activation of PBMC cells compared with GN women, and

silibinin showed modulatory activity on the inflammatory response, suggesting its use as adjuvant therapy in preeclampsia.

Key word: Preeclampsia; NF-kB; TNF- α ; IL-1 β ; Silibinin.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	11
2. Revisão Bibliográfica.....	13
2.1. Pré-eclâmpsia.....	13
2.2. Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α).....	15
2.3. Interleucina - 1 β (IL-1 β).....	17
2.4. Fator de transcrição nuclear – kB (NF-kB).....	18
2.5. Silimarina e silibinina.....	20
3. Objetivos.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. Materiais e métodos.....	22
4.1. Pacientes e controles.....	22
4.1.1. Critérios de inclusão.....	23
4.1.2. Critérios de exclusão.....	23
4.2. Dosagem da proteinúria.....	23
4.3. Colheita de sangue.....	23
4.4. Isolamento e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	24
4.5. Obtenção de sobrenadantes de cultura de PBMC.....	24
4.6. Extração nuclear de células mononucleares.....	25

4.7.	Quantificação de proteínas.....	25
4.8.	Determinação da atividade de p65 NF-kB.....	25
4.9.	Determinação de citocinas no sobrenadante de PBMC.....	26
4.10.	Análise estatística.....	27
5.	Resultados.....	28
5.1.	Características das gestantes e mulheres não-grávidas.....	28
5.2.	Determinação de NF-kB em células mononucleares.....	30
5.3.	Determinação de IL-1 β	31
5.4.	Determinação de TNF- α	33
6.	Discussão.....	35
7.	Referências Bibliográficas.....	41
8.	Anexo A.....	53

1. INTRODUÇÃO:

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

A lesão e disfunção da célula endotelial são eventos comuns a todos os achados patológicos da PE, que parece estar associada a uma regulação inadequada do sistema imune materno, levando à prevalência do perfil Th1 ao invés do perfil Th2, que ocorre nas gestações não complicadas (SAITO & SAKAI, 2003; JONSSON et al., 2006). Portanto, 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). A ativação de granulócitos e monócitos descrita na PE sugere o envolvimento dessas células nos mecanismos fisiopatológicos dessa doença (OIAN et al., 1985; LUPPI & DELOIA, 2006). Além disso, foi demonstrado aumento na expressão de marcadores de ativação na superfície celular, assim como produção de reativos intermediários do oxigênio em gestantes com PE (SACKS et al., 1998; PERAÇOLI et al., 2011).

Essa patologia é caracterizada por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (REDMAN & SARGENT, 2003; LUPPI & DELOIA, 2006; LOCKWOOD et al., 2011) 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- β) (VISSER et al., 2007; PERAÇOLI et al., 2008). PERAÇOLI et al. (2007), avaliando a produção de TNF- α em gestantes normais e com PE, verificaram que tanto os níveis séricos como a produção endógena da citocina por monócitos de sangue periférico foram significativamente mais elevados em gestantes com PE. Observou-se ainda, aumento dos níveis sérios de IL-6 e IL-1 β em pacientes pré-eclâmplicas quando comparadas a grávidas normotensas (KALINDERIS et al., 2011).

A produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas que medeiam a inflamação e adesão vascular depende da ativação da via de transdução de sinal do fator de transcrição nuclear-kappa B (NF-kB) (MATSUSAKA et al., 1993; CHEN et al., 1995; STRIZ et al., 2011). O NF-kB está presente na forma inativa no citoplasma como heterodímero composto pelas subunidades p50 e p65 ligadas a proteína inibitória IκB. Quando a célula é ativada, ocorre a fosforilação de IκB, permitindo a translocação de p50/p65 até o núcleo para transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias. HASEGAWA et al. (2003) demonstraram ativação de NF-kB em PBMC de sangue periférico de recém-nascidos com asfixia neonatal e sequelas neuronais. Os autores sugerem que citocinas inflamatórias como TNF-α, produzidas no sistema nervoso central, podem entrar na circulação periférica e ativar o NF-kB nessas células. Assim, o nível de ativação do NF-kB em PBMC, bem como a inflamação mediada pela ativação desse fator nuclear podem refletir a gravidade da encefalopatia causada pela asfixia neonatal.

LUPPI et al. (2006) descreveram a ativação de NF-kB em leucócitos de portadoras de PE relacionada com elevados níveis séricos de IL-6. Portanto, nessa patologia, a ativação excessiva de monócitos e granulócitos intravasculares, bem como de macrófagos, sugere que a ativação do sistema imune inato pode causar problemas na progressão da gestação. Nesse sentido, o emprego de agentes moduladores da reação inflamatória seria uma alternativa para o tratamento da doença.

A silibinina, o composto mais ativo da silimarina, um extrato obtido de frutos e sementes de *Silybum marianum*, apresenta interessantes atividades de citoproteção, anti-inflamatórias, antifibróticas e anticarcinogênicas (KREN & WALTEROVA, 2005). É utilizado como hepatoprotetor há mais de dois mil anos e reportado como a preparação mais frequentemente utilizada por pacientes voluntários com câncer (SINGH et al., 2004). A silimarina é constituída por 70% de flavonóides, sendo eles: *silybin* (60-70%), *silychristin* (20%), *silydianin* (10%) e *isosilybin* (5%) e, outros 30% de uma fração quimicamente indefinida, contendo compostos polifenólicos poliméricos e oxidados (RUI, 1991; KREN & WALTEROVA, 2005; PRADHAN & GIRISH, 2006). A silibinina parece interferir na cascata de transdução controlada pelo NF-kB, suprimindo a fosforilação e degradação de IκB e diminuindo assim a translocação de NF-kB para o núcleo (ZANDI et al., 1997; KREN

& WALTEROVA, 2005; COMELLI et al., 2007). A inibição desse fator de transcrição tem sido empregada na tentativa de atenuar as atividades inflamatórias em monócitos humanos ativados por lipopolissacáride (LU & WAHL, 2005). BANNWART et. al. (2010) demonstraram que a adição de silibinina à cultura de monócitos humanos desafiados *in vitro* com *Paracoccidioides brasiliensis* suprimiu significativamente a ativação de NF- κ B e a produção de TNF- α pelas células estimuladas com o fungo. Esses autores também verificaram que a silimarina, bem como a silibinina não apresentam atividade citotóxica sobre monócitos humanos, mesmo quando tratados com altas doses desses flavonóides.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar o estado de ativação das células PBMC de mulheres com PE com as das gestantes saudáveis e mulheres não-grávidas e, avaliar se o tratamento dessas células com silibinina pode modular a ativação de NF- κ B e a produção de citocinas inflamatórias na pré-eclâmpsia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pré-eclâmpsia

Na gestação, hipertensão é definida como pressão arterial sistólica igual ou maior que 140 mm Hg e pressão diastólica igual ou maior que 90 mm Hg detectadas após a 20^a semana de gestação em mulheres previamente normotensas (NHBPEP, 2000). Mais que 25% das gestantes com hipertensão desenvolvem proteinúria ($\geq 0,3$ g de proteína em urina de 24h), caracterizando a PE (SAUDAN et al., 1998). Além de hipertensão e proteinúria, há inúmeros outros sinais e sintomas na PE, tais como edema, dor de cabeça, distúrbios visuais, e dor epigástrica que se manifestam de acordo com a gravidade da doença (ACOG, 2002).

A incidência exata de PE é desconhecida, porém estudos sugerem ocorrer em aproximadamente 5% a 7% das gestações (UNAL et al., 2007). A PE é principalmente uma doença que ocorre na primeira gestação, mas outros fatores de risco estão envolvidos como: gestação múltipla, PE em uma gestação prévia, feto com paternidade diferente dos filhos anteriores, hipertensão crônica, diabetes pré-gestacional, doença vascular, nefropatia, síndrome do anticorpo antifosfolípide, obesidade, idade de 35 anos ou mais, e raça africana-americana (ACOG, 2002; ROBILLARD et. al., 2011; TROGSTAD et. al., 2011).

Apesar de ser uma das principais causas de mortalidade materna e fetal (SAITO et al., 2007), esta é uma doença que ainda não possui uma etiologia bem definida, nem um diagnóstico precoce, tampouco um tratamento eficaz que evite os partos prematuros. Os conhecimentos sobre a fisiopatologia da pré-eclâmpsia se inovam constantemente com o passar dos anos; entretanto, é unanimemente aceito ser uma doença multisistêmica, centralizada na disfunção vascular, em que a hipertensão é apenas uma de suas manifestações (DEKKER & SIBAI, 1998).

De acordo com NHBPEP (2000), a PE pode ser classificada como leve ou grave conforme a gravidade dos sintomas. A PE é considerada grave quando um ou mais dos seguintes critérios estiverem presentes: I-) pressão arterial sistólica ≥ 160 mm Hg ou pressão diastólica ≥ 110 mm Hg em duas ocasiões com pelo menos 6 horas de intervalo enquanto a paciente permanece em repouso, II-) 5 g ou mais de proteinúria presente em urina de 24 horas, III-) volume de urina de 24 horas menor que 500 mL, IV-) distúrbios visuais ou cerebrais, V-) edema pulmonar ou cianose, VI-) dor epigástrica, VII-) função hepática prejudicada, VIII-) trombocitopenia e IX-) restrição do crescimento fetal (ACOG, 2002).

Mais recentemente, definiu-se uma outra forma de classificar a PE: em precoce (manifestações ocorrem antes da 34^a semana de gestação) ou tardia (manifestações ocorrem a partir da 34^a semana de gestação) (VON DADELSZEN et al., 2003; HUPPERTZ, 2008). Tem sido sugerido que a PE precoce, com aproximadamente 5% a 20% dos casos de PE e, a PE tardia, com mais de 80% dos casos de PE, apresentam diferentes etiologias, podendo ser consideradas duas entidades distintas. A PE tardia, geralmente, manifesta-se de uma forma mais branda, não afeta o crescimento fetal, não altera drasticamente o comportamento das artérias uterinas (Doppler normal), mantém-se o fluxo sanguíneo normal nas artérias umbilicais. Já a PE precoce manifesta-se de forma mais severa e é caracterizada por: invasão trofoblástica inadequada ou incompleta, alterações do fluxo sanguíneo nas artérias espiraladas da placenta (Doppler alterado), fluxo sanguíneo anormal nas artérias umbilicais e sinais evidentes de restrição do crescimento fetal (HUPPERTZ, 2008).

A eclâmpsia é a principal complicação neurológica da PE, definida como uma manifestação convulsiva e/ou distúrbios da consciência que ocorrem em um contexto de PE (COLLANGE et. al., 2010). Algumas mulheres apresentam as manifestações de PE antes de desenvolver a eclâmpsia; porém, em 38% dos casos,

as crises convulsivas ocorrem anteriormente ao aparecimento de hipertensão e proteinúria (DOUGLAS & REDMAN, 1994). A eclâmpsia pode ocorrer após o parto (BEACH & KAPLAN, 2008). Esta complicação atinge 1% a 2% de casos com PE grave (BEGUM et. al., 2002).

Uma outra complicação da PE é a chamada Síndrome HELLP, cuja sigla em inglês significa hemólise, aumento de enzimas hepáticas e diminuição no número de plaquetas. Esta complicação ocorre em aproximadamente 20% das mulheres que desenvolvem PE grave (SIBAI et. al., 1993) e está associada com um prognóstico ruim para a mãe, incluindo dano renal, hematoma hepático subcapsular, pré-eclâmpsia recorrente, parto prematuro, podendo levar à morte materna ou fetal (ACOG, 2002).

Esta é uma doença de alta incidência e cujas conseqüências podem afetar toda uma família. Estes motivos vêm instigando pesquisadores do mundo inteiro a elucidar os aspectos obscuros sobre a etiologia, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento da pré-eclâmpsia.

2.2. Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

Fator de Necrose Tumoral- α , também chamado de caquexina ou caquetina, é uma citocina inflamatória pleiotrópica. Foi primeiramente isolada em 1975 e identificada como um fator citotóxico responsável por necrose e hemorragia tumoral (CARSWELL et al., 1975). O gene responsável por essa citocina localiza-se no cromossomo 6 e é formado por quatro éxons e três íntrons (SPRIGGS et al., 1992).

A proteína TNF- α é primeiramente produzida como uma proteína transmembrânica contendo 212 aminoácidos (TANG et al., 1996). Nesta forma, a função biológica do TNF- α ocorre através de contato célula a célula, ou pode ser clivado pela Enzima Convertora de TNF-alfa (TACE), uma metaloproteinase e, tornar-se uma proteína solúvel (BLACK et al., 1997). As principais células sintetizadoras de TNF- α são as da linhagem monocítica, como os macrófagos, mas também esta citocina pode ser produzida por células epiteliais, fibroblastos e tecido nervoso (HAIDER & KNÖFLER, 2009). O principal estímulo para a produção de TNF- α é o lipopolissacarídeo (LPS) liberado em grande quantidade em infecções por bactérias gram-negativas (GUHA et al., 2001). Esta citocina está envolvida com a inflamação, sendo responsável por ativar macrófagos, regular a produção de

citocinas inflamatórias, aumentar a produção de mediadores lipídicos como prostaglandinas e fator ativador de plaquetas, além de estar envolvido com o processo de aterosclerose e osteoclastogênese, entre outros (PARAMESWARAN & PATIAL, 2010).

As funções biológicas de TNF- α ocorrem mediante a ligação dessa citocina com seus receptores de membrana, TNFR1 e TNFR2. O TNFR1 é expresso constitutivamente na maioria dos tecidos de mamíferos, enquanto o TNFR2 possui uma expressão altamente regulada, sendo expresso nas células do sistema imune (PARAMESWARAN & PATIAL, 2010). Há diferenças entre a sinalização dependente de TNFR1 e TNFR2. Enquanto a ativação de TNFR1, relacionada com lesão tecidual, leva à inflamação e à via de morte celular programada, a sinalização através de TNFR2 é pouco entendida, podendo induzir apoptose, mas também permitir a sobrevivência celular através da reparação tecidual e da angiogênese (BRADLEY, 2008).

O domínio citoplasmático do TNFR1 não estimulado fica ligado com um domínio silenciador SODD que previne a sinalização constitutiva de TNFR1 (JIANG et al., 1999). Mediante uma estimulação, SODD é liberado e uma proteína TRADD (Domínio de Morte associado ao receptor de TNF) se liga e recruta RIP-1 (Proteína 1 que Interage com Receptor) (HSU et al., 1996), TRAF-2 (Fator 2 Associado ao TNFR) e proteínas inibidoras da apoptose cIAP1 e cIAP2 formando o complexo I. Este complexo ativa o NF- κ B, fosforilando I κ B via MEKK-3 (YANG et al., 2001). Além dessa via de sinalização, a ativação de TNFR-1 pode levar à morte celular por apoptose através da ativação de caspase 3 (WANG et al., 2008) ou pode ativar o fator de transcrição AP-1 via JNKs (TOBIUME et al., 2001) que, assim como o NF- κ B, tem papel na inflamação e sobrevivência celular (HAIDER & KNÖFLER, 2009).

A literatura mostra o grande envolvimento do TNF- α com doenças inflamatórias como: artrite reumatóide (FELDMANN & MAINI, 2002), Doença de Crohn (MARTINEZ-BORRA et al., 2002), aterosclerose (ROSS et al., 1999), sepse (VAN DER POLL & VAN DEVENTER, 1999), diabetes, obesidade (SHOELSON et al., 2007), entre outras. Na pré-eclâmpsia, foi detectado aumento dos níveis de TNF- α no soro materno e do cordão umbilical (TOSUM et al., 2010), no plasma (PERAÇOLI et al., 2007), na placenta (WANG & WALSH, 1996) e no sobrenadante de cultura de monócitos (PERAÇOLI et al., 2007; PERAÇOLI et al., 2011) comparado às gestantes normotensas.

2.3. Interleucina - 1 β (IL-1 β)

A família de citocinas IL-1 é composta por onze proteínas, entre elas IL-1 α e IL-1 β , codificadas por onze genes diferentes (DUNN et al., 2001). A principal função de citocinas tipo IL-1 é controlar a resposta inflamatória decorrente de uma lesão tecidual causada por infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias ou por inflamação crônica estéril (DINARELLO, 2009). Monócitos e macrófagos representam a principal fonte de IL-1 no organismo (NETEA et al., 2009); porém células endoteliais (BANDMANN et al., 2002), epiteliais (HOFFMAN et al., 2005) e fibroblastos (HOLZBERG et al., 2003) também podem produzir IL-1 α e IL-1 β .

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 Toll-like (TLR) (receptor de superfície celular) e Nod-like (NLR) (receptor citoplasmático) desencadeando a ativação de diversos fatores de transcrição responsáveis pela transcrição do precursor da IL-1 β (pró-IL-1 β) que é biologicamente inativo. A pró-IL-1 β é clivada por caspase 1 resultando na geração de IL-1 β biologicamente ativa que, subsequentemente, é secretada no meio extracelular (EDER, 2009).

A caspase 1 é uma protease regulada por uma cascata proteolítica gerada pelo inflamassomo, que é um complexo multiprotéico. O inflamassomo NALP-3 é o responsável pela clivagem de pro IL-1 β e é formado pela proteína NALP-3 (pertencente à família dos NLRs), proteína adaptadora ASC e caspase 1 (anteriormente conhecida por enzima convertora de IL-1 β). Mediante a ligação com PAMPs ou DAMPs, o domínio C-terminal da proteína NALP-3 interage e recruta a proteína adaptadora ASC que, então se liga à caspase 1. A caspase 1 torna-se ativa e cliva a pró-IL-1 β (33 kD) em IL-1 β madura (17 kD) (WILSON et al., 1994; WEBER et al., 2010).

A secreção de IL-1 β não ocorre através da via de secreção clássica dependente do retículo endoplasmático e Golgi como ocorre com a maioria das citocinas. Alguns mecanismos são propostos ocorrer: I) exocitose de lisossomos secretórios, II) desprendimento de microvesículas da membrana plasmática, III) exocitose de exossomos e IV) exportação através de proteínas transportadoras específicas na membrana plasmática (QU et al., 2007; EDER, 2009).

A IL-1 β pode agir em dois receptores de membrana, o IL-1RI e o IL-1RII. O receptor do tipo I é expresso na grande maioria das células. Já o do tipo II está presente apenas na superfície de células B e não induz resposta para IL-1 β , funcionando com um bloqueador da ação dessa citocina (KUNO & MATSUSHIMA, 1994). Um outra forma de bloquear a ação da IL-1 β em nosso organismo é através do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), que é uma molécula produzida por macrófagos e que impede a ligação de IL-1 ao IL-1R (DINARELLO, 2000).

A ligação de IL-1 β ao IL-1RI promove a mudança conformacional desse receptor, promovendo a aproximação de IL-1RAcP (proteína acessória do receptor de IL-1) e formação do complexo heterodimérico do receptor de IL-1 (DINARELLO, 2009). Os domínios TIRs (região conservada na porção citoplasmática do receptor Toll-Like e de IL-1R) desse complexo recrutam moléculas adaptadoras intracelulares, como MyD88 (fator 88 de diferenciação mielóide), IRAK (quinase associada a IL-1R) e TRAF-6 (fator 6 associado ao receptor de TNF), que ativam vias de transdução de sinal do NF- κ B, AP-1 (proteína ativadora – 1), JNK (quinase c-Jun N-terminal) e p38 MAPK (proteína quinase associada a mitógeno) (DUNNE & O`NEIL, 2003).

Assim como o TNF- α , a IL-1 β está envolvida em várias doenças inflamatórias, incluindo doenças auto-imunes (GOLDBACH-MANSKY & KASTNER, 2009). Com relação à pré-eclâmpsia, a literatura apresenta alguns dados conflitantes sobre os níveis de IL-1 β no soro. CASART et al. (2007) reportaram níveis séricos de IL-1 β semelhantes em gestantes normotensas e gestantes com PE. Já KALINDERIS et. al. (2011) notaram um significativo aumento dos níveis de IL-1 β sérico em pacientes com pré-eclâmpsia comparado às gestantes normotensas. Na placenta, RINEHART et. al. (1999) reportaram um aumento da expressão de IL-1 β .

2.4. Fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B)

O fator de transcrição nuclear κ B foi primeiramente identificado em células B como uma proteína que reconhece e se liga de uma maneira específica a uma sequencia “enhancer” do gene da cadeia leve k de imunoglobulinas (SEN & BALTIMORE, 1986). Atualmente, o NF- κ B é considerado como um dos principais reguladores das respostas imunes inata e adaptativa (BONIZZI & KARIM, 2004).

O NF- κ B é encontrado no citoplasma na forma de dímeros compostos por membros da família de fatores de transcrição NF- κ B. A família NF- κ B é

caracterizada pela presença de um domínio N-terminal homólogo a Rel responsável pela homo ou heterodimerização e pela ligação a uma sequência específica de DNA (HAYDEN & GHOSH, 2008). Esta família é composta por cinco membros: p50, p52, RelA (também chamado de p65), c-Rel e RelB (GHOSH et. al., 1998). Há forte evidência que dímeros diferentes regulam diferentes conjuntos de genes (SEN & SMALE, 2009).

O principal regulador da atividade de NF- κ B é a proteína inibitória I κ B, que é encontrada associada ao NF- κ B no citoplasma de células não estimuladas ou em repouso. Durante a estimulação celular, I κ B é fosforilado, ubiquitinado e degradado, permitindo a translocação de NF- κ B ao núcleo (SEN & SMALE, 2009). A fosforilação de I κ B é mediada pelo complexo IKK após ativação de receptores como Toll-like (TLR), receptores de TNF (TNFR) e IL-1 (IL-1R) (VALLABHAPURAPU & KARIN, 2009). Por exemplo: a ligação de LPS ao TLR-4 ativa este receptor, que por meio de proteínas adaptadoras TIRAPs ou TRAMs se ligam a MyD88 e TRIF, respectivamente. Através da proteína IRAK-1, MyD88 se associa a proteína TRAF-6 que se liga ao complexo TAB1/2/3 levando a ativação de IKK mediada por TAK-1. A ativação de IKK promove a fosforilação de I κ B e, conseqüentemente, a translocação de NF- κ B ao núcleo e transcrição de genes como o do TNF- α e IL-1 β (KAWAI & AKIRA, 2007).

A ativação de NF- κ B é reversível devido à exportação de NF- κ B dependente de I κ B. Um dos primeiros genes alvo do NF- κ B codifica I κ B α que imediatamente após sintetizada entra no núcleo na forma de monômero e se associa ao dímero p50/p65 ligado ao DNA, inativando-o e exportando-o para o citoplasma (HUANG & MIYAMOTO, 2001). Outra forma de regular a atividade de NF- κ B pode ser através da ubiquitinação de p65 por ligases E3 (SOCS1 em conjunto com COMMD1 e PDLIM2) e subseqüentemente, sua degradação pelo proteassoma (MAINE et. al., 2007; TANAKA et. al., 2007).

A atividade de NF- κ B está envolvida com a diferenciação mielóide e desenvolvimento de linfócitos T, B e células NK. A ativação fisiológica de NF- κ B medeia a expressão de genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular, bem como genes envolvidos na inflamação. O desequilíbrio da ativação de NF- κ B pode provocar a expressão exacerbada de genes envolvidos na proliferação celular e, por exemplo, causar um tumor (VALLABHAPURAPU & KARIN, 2009).

O NF-kB é um fator de transcrição essencial para uma fisiologia celular normal. Entretanto, a ativação do NF-kB ocorre em situações patológicas, como na sepse (ABRAHAM & SINGER, 2007). Na sepse, sua ativação exacerbada está intimamente relacionada com danos mais extensos nos pulmões e disfunção de órgãos (BÖHRER et. al., 1997; ABRAHAM & SINGER, 2007). Na pré-eclâmpsia, monócitos apresentam uma maior ativação de NF-kB (LUPPI et. al., 2006) comparado com gestantes normotensas, assim como a placenta de gestação complicada por PE apresenta uma maior expressão desse fator de transcrição (ABAN et. al., 2004).

2.5. Silimarina e Silibinina

Silybum marianum (Família: Asteraceae/Compositae) é uma das plantas mais antigas e bem pesquisadas no tratamento de doenças hepáticas (PRADHAN & GIRISH, 2006). A planta é natural no sul da Europa, sul da Rússia e Ásia Menor e está adaptada a América do Norte e do Sul tão bem quanto no sul da Austrália (ABENAVOLI et al., 2010). Ela nasce robustamente em solos rochosos e clima quente e possui flores roxas que florescem nos meses de julho e agosto (PRADHAN & GIRISH, 2006; ABENAVOLI et al., 2010). O fruto de *Silybum marianum* possui cerca de 5-7 mm de comprimento, até 2-3 mm de largura e 1,5 mm de espessura com uma casca brilhante de cor preta acastanhada a acinzentada. O fruto moído tem odor de cacau, é oleoso e apresenta sabor amargo (CAPASSO et al., 2003).

O extrato de *S. marianum* começou a ser utilizado 400 anos antes de Cristo e seu uso foi primeiramente reportado por Theophrastus (ROSS, 2008). Os compostos ativos são extraídos de sementes secas e consiste de quatro isômeros de flavolignanas cuja fórmula empírica é $C_{25}H_{22}O_{10}$ e que, conjuntamente, são chamados de silimarina. Entre esses isômeros, a silibinina (Figura 1) é o principal componente ativo e representa aproximadamente 60% a 70% da composição, seguido por *silychristin* (20%), *silydianin* (10%) e *isosylibin* (5%) (SALLER et al., 2001).

Além de ser um ótimo hepatoprotetor, a silimarina apresenta propriedades antioxidantes, citoprotetoras, anti-inflamatórias e antifibróticas. Ela pode atuar impedindo a ação de radicais livres, interagindo diretamente com componentes da membrana plasmática evitando danos lipídicos, aumentando a formação de ribossomos e síntese de proteínas e DNA e, interferindo na ativação de NF-kB. Em

hepatoma de linhagem celular HEP G2, silimarina suprimiu a ligação de NF- κ B ao DNA e a expressão dos genes dependentes de NF- κ B (SALIOU et al., 1998) . Em um outro estudo, baixas doses de silimarina resultaram na supressão de linfócitos T; porém altas doses estimularam o processo inflamatório, demonstrando que a silimarina pode modular a resposta imune (JOHNSON et al., 2002). SCHÜMANN et al. (2003) demonstraram, em modelo experimental de hepatite induzida por concanavalina A, que a silibinina atuou como modulador da resposta imune, inibindo a expressão de TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-2 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), além de estimular a síntese de IL-10.

Além de sua ação hepatoprotetora, estudos sugerem que a silimarina e a silibinina possuem propriedades quimiopreventivas em modelos animais de carcinogênese, incluindo câncer de pele (SINGH & AGARWAL, 2002), além de apresentar eficácia no combate aos cânceres de próstata e pulmão (SINGH et al., 2002; SINGH et al., 2006). A silimarina é uma das preparações de plantas medicinais mais utilizadas voluntariamente por pacientes com câncer (WENEKE et al., 2004). Em modelo de carcinogênese de pele em camundongos, a atividade antioxidante da silibinina apresentou importante papel na proteção contra lesões de pele, quimicamente induzidas ou provocadas por radiação (SINGH & AGARWAL, 2005). Uma das mais recentes sugestões do uso de silibinina foi como cosmético para proteger a pele dos efeitos da idade e da radiação presente no ambiente; porém os efeitos adversos dessa aplicação não estão ainda bem estudados (SINGH & AGARWAL, 2009).

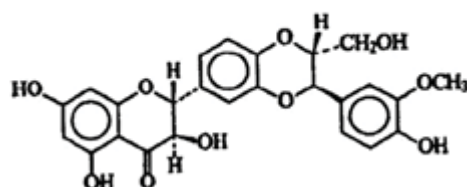


Figura 1. Estrutura química da silibinina, o principal componente ativo da silimarina

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o estado de ativação de células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de PE e o efeito da silibinina sobre a ativação de NF-kB e a produção de citocinas inflamatórias por essas células.

3.2. Objetivos Específicos

Determinar a concentração da subunidade p65 de NF-kB no núcleo de células mononucleares de mulheres normais não-grávidas, gestantes normotensas saudáveis e gestantes portadoras de PE, cultivadas na ausência ou presença de silibinina (5 uM ou 50 uM) por 30 min e estimuladas ou não com lipopolissacáride (LPS).

Avaliar a produção das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β por células mononucleares de mulheres normais não-grávidas, gestantes saudáveis e gestantes portadoras de PE após cultivo na ausência ou presença de silibinina (5 uM ou 50 uM) por 18h.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Pacientes e controles

Foram estudadas 34 gestantes portadoras de PE (grupo estudo) e 20 primigestas saudáveis, normotensas (grupo controle), atendidas 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^a. semana de gestação (NHBPEP, 2000).

Também foram avaliadas 15 mulheres saudáveis, não-grávidas, de faixa etária semelhante à das gestantes, recrutadas entre doadoras voluntárias 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, protocolo n.º. 3443-2010 (Anexo A).

4.1.1. Critérios de inclusão

Grupo controle (mulheres não-grávidas): ser saudável, não-grávida e doadora voluntária do banco de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP;

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

Grupo estudo (pré-eclâmpsia): ser primigesta e portadora de pré-eclâmpsia, sem outras complicações clínicas ou obstétricas.

4.1.2. Critérios de exclusão

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

4.2. Dosagem da proteinúria

A proteinúria em urina de 24 horas foi quantificada por método colorimétrico, no sistema de automação Technicon RAXT, do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

4.3. Colheita de sangue

A colheita de sangue, para avaliação da ativação do NF-kB e produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico, de gestantes portadoras de PE foi feita no momento do diagnóstico da doença e, a de gestantes normais no momento em que foram consultadas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. A amostra de sangue de mulheres não-grávidas foi obtida a partir do sangue doado no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

4.4. Isolamento e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

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). As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), segundo a técnica descrita por Boyum (1968). O anel rico em células mononucleares foi lavado com meio RPMI 1640 (Sigma) por 10 min a 200 g duas vezes. Após esses procedimentos as células foram ressuspendidas 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, 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 2×10^6 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 incubadas a 37°C, em tensão de 5% de CO₂.

4.5. Obtenção de sobrenadantes de cultura de PBMC

As células mononucleares foram incubadas a 37°C, em tensão de 5% de CO₂, na ausência ou na presença de silibinina (Sigma) nas concentrações de 5µM ou 50µM. Como controle positivo, essas células foram estimuladas com lipopolissacáride (LPS) de *Escherichia coli* O₅₅B₅ (Sigma) na concentração de 1 µg/mL. Após 18h de cultivo, o sobrenadante foi aspirado, submetido à centrifugação a 400 g e distribuído em alíquotas, que foram conservadas a -80°C para posterior dosagem de TNF-α e IL-1β pela técnica de ELISA.

4.6. Extração nuclear de células mononucleares

As células mononucleares de mulheres saudáveis, gestantes normais e com pré-eclâmpsia, obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma) foram cultivadas por 30 min com silibinina nas concentrações de 5 μ M e 50 μ M e estimuladas ou não com LPS (Sigma). Após esse período, utilizando o kit de extração nuclear (Cayman Chemical Company, Michigan, USA), PBMC na concentração de 2×10^6 células/mL foram cultivados em suspensão a 37°C em tubos de polipropileno (Falcon 2059, Falcon Labware, Oxnard, CA, USA) sob diferentes condições experimentais. As células foram então centrifugadas a 4°C e 300 g por 5 min e ressuspendidas em 5 mL de tampão fosfato-salino, gelado, com inibidores de proteases por 5 min a 300 g e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 500 μ L de tampão hipotônico gelado foram adicionados aos pellets e transferidos a microtubos de microcentrifugas. Após incubação por 15 min no gelo, adicionou-se 50 μ L de Nonidet P-40 e os microtubos centrifugados por 30 seg. O sobrenadante foi armazenado a -80°C contendo a fração citosólica dessas células. Os pellets foram ressuspendidos em 50 μ L de tampão de extração nuclear completo e agitados por 15 min em agitador tipo Vortex e então centrifugados a 14000 g a 4°C por 10 min. A fração nuclear presente no sobrenadante foi alíquotada e armazenada a -80°C até sua utilização.

4.7. Quantificação de proteínas

A concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Uma curva padrão de diluição de BSA em tampão salina a partir de 1mg/mL foi utilizada como padrão para a determinação da quantidade protéica das amostras e 10 μ L de cada extrato nuclear, obtido dos diferentes tratamentos, foram colocados na placa de 96 wells e diluídos com 90 μ L de tampão salino. Após 30 min de incubação, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 750 nm em leitor de ELISA. Os resultados foram expressos em μ g/mL de proteína.

4.8. Determinação da atividade de p65 NF-kB

Utilizando o kit específico de fator de transcrição p65 NF-kB (Cayman Chemical), 10 μ L da fração nuclear obtida de PBMC foram dosados segundo as instruções do fabricante. O extrato nuclear foi incubado em placa de 96 wells contendo uma seqüência específica de dupla fita de DNA (GGGACTTTCC 5'-3')

para avaliar a afinidade com a subunidade p65NF-kB. A ligação de p65NF-kB com o oligonucleotídeo alvo foi detectada através da incubação com um anticorpo primário específico para a forma ativada de p65 e, em seguida, visualizado por incubação com anti-IgG conjugado com peroxidase em concentrações ideais em uma solução de desenvolvimento, tal como descrito pelo fabricante. A concentração de p65NF-kB encontrada em PBMC obtidas dessas mulheres normais, não grávidas, gestantes normais ou com PE foi quantificada em comprimento de onda de 450nm corrigido em 655 nm (Multiskan), tendo como cálculo-base o controle positivo fornecido pelo kit. A concentração de p65NF-kB encontrada foi dividida pela quantidade de proteína nuclear presente nessas células e multiplicada por 100 devido às diluições realizadas durante o ensaio. Os resultados foram expressos em ug de p65NF-kB/ug de proteína.

4.9. Determinação de citocinas no sobrenadante de PBMC

A pesquisa das citocinas TNF- α e IL-1 β em sobrenadantes de cultura de células mononucleares, cultivadas ou não com silibinina (5 ou 50 μ M), 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.

Para a dosagem de TNF- α , as placas foram sensibilizadas por 18 h a 5°C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-TNF- α humano ou anti-IL-1 β humano (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), diluídos em tampão fosfato pH 7,2 (PBS), na concentração de 2 μ g/mL. Após esse período os orifícios foram lavados 4 vezes com 300 μ L de PBS, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). O bloqueio da placa foi realizado colocando-se em cada orifício 300 μ L de PBS contendo 1% de soro albumina bovina (BSA-Sigma) à temperatura ambiente por 2 h. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100 μ L dos sobrenadantes gerados e das citocinas TNF- α e IL-1 β recombinante humano (R & D Systems), em concentrações específicas para cada uma, foram adicionados à placa. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente realizou-se nova lavagem da placa, sendo adicionado o anticorpo revelador policlonal de coelho anti-TNF- α ou anti-IL-1 β humano conjugados com biotina (R & D Systems) na concentração de 100 ng/mL em PBS contendo 0,1% BSA por 2 h à temperatura ambiente. A placa foi então lavada 4

vezes com PBST e incubada com estreptoavidina conjugada com peroxidase (Sigma), na concentração de 2 ug/mL por 60 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 H₂O₂ a 30% (Sigma). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min, a reação foi bloqueada pela adição de 50 uL de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Multiskan, EFLAB, Helsinki, Finland) 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.

4.10. Análise Estatística

A avaliação das características dos grupos GN, NG e PE foi realizada por análise de variância não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis). Os dados referentes ao efeito da silibinina sobre a produção de citocinas e ativação de p65NF-kB foram avaliados por análise de variância (ANOVA), empregando-se testes paramétricos, segundo o programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego, California. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Características das gestantes e mulheres não-grávidas

As 20 gestantes normotensas, que constituíram o grupo controle eram acompanhadas no Ambulatório de Pré-natal de baixo-risco do Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. As 34 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia estavam internadas na Enfermaria de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e, o grupo de mulheres não-grávidas foi constituído por 15 mulheres saudáveis, doadoras voluntárias de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. 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. A proteinúria de 24 horas do grupo PE variou de 300 mg a 6.740 mg, sendo a mediana no valor de 780 mg. O grupo de gestantes com PE apresentou valores de pressão arterial sistólica e diastólica significativamente mais elevados em relação aos grupos de gestantes normotensas e de mulheres não-grávidas.

Tabela 1. Distribuição das gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, gestantes normais e mulheres normais não-grávidas quanto à idade, idade gestacional, valores da pressão arterial sistólica e diastólica e de proteinúria.

Parâmetros	Mulheres não-grávidas (NG)	Gestantes normais (GN)	Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE)
Idade (anos)	26 (20 - 35)	23 (15 – 39)	26 (13 – 38)
Idade gestacional (semanas)	—	33 (24 – 39)	35 (24 – 40)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	110 (100– 120)	105 (95-110)	150 * (140 – 230)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	70 (65 – 80)	60 (60 – 70)	100 * (90 – 160)
Proteinúria (mg/24h)	negativa	negativa	780 (300 – 6.740)

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)

5.2. Determinação de NF-kB em células mononucleares

Na Figura 2 observa-se que a atividade endógena de NF-kB foi significativamente mais elevada em PBMC de gestantes portadoras de PE do que em gestantes normotensas (GN). Embora os valores observados em gestantes com PE não sejam estatisticamente significativos em comparação aos obtidos de mulheres não-grávidas, houve tendência a maiores níveis do fator em gestantes pré-eclâmpticas. O gráfico também permite sugerir que o perfil de ativação das células de gestantes normotensas está diminuído em relação aos grupos PE e NG. Quando as células foram estimuladas com LPS observou-se aumento significativo da expressão de NF-kB em células de gestantes do grupo GN e de mulheres NG. Ao contrário, a expressão desse fator de transcrição mostrou-se significativamente menor no grupo de gestantes com PE. Esses resultados sugerem que a ativação endógena das células de gestantes com PE interfere com a expressão de NF-kB, quando as células são submetidas a estímulo com LPS.

O tratamento de PBMC com silibinina na dose de 5 uM inibiu a ativação endógena de p65NF-kB apenas no grupo PE, enquanto a dose de 50 uM teve efeito inibidor nos três grupos estudados. As doses de 5 uM 50 uM inibiram, de maneira significativa, a atividade da subunidade desse fator de transcrição nuclear quando as células dos três grupos foram estimuladas com LPS.

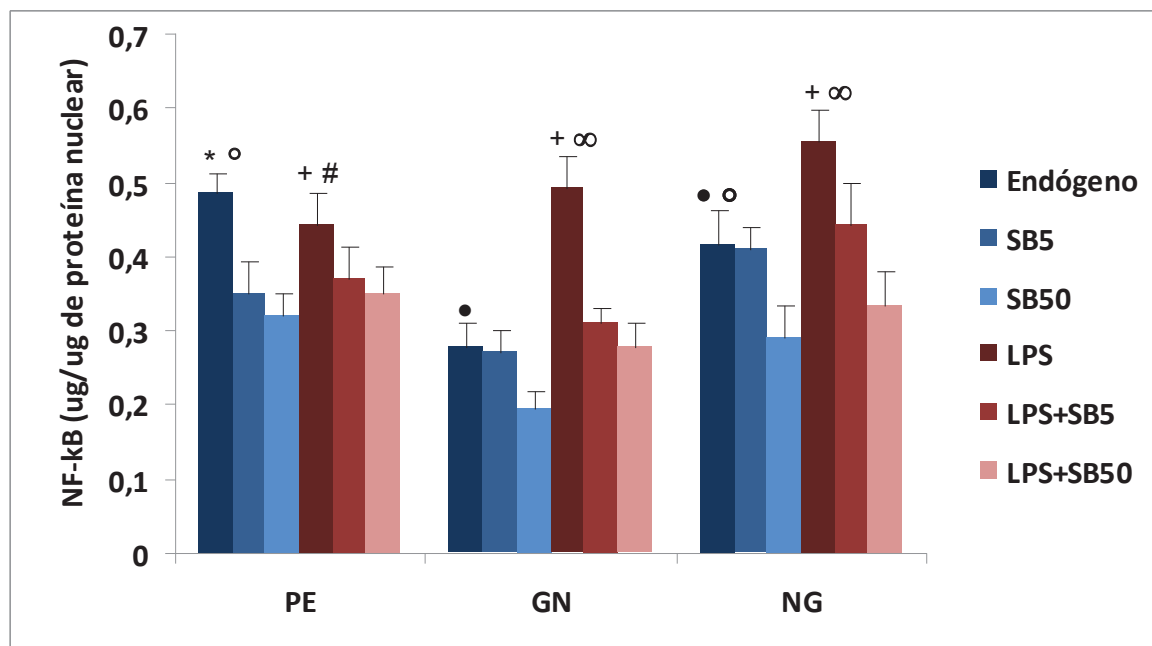


Figura 2. Atividade de NF-kB em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG). PBMC dos três grupos foram cultivados na presença ou ausência de silibinina (SB) nas concentrações de 5uM e 50 uM e estimulados ou não com 1 ug/mL de lipopolissacáride (LPS) por 30 min.

* ($p < 0,05$) vs SB5 e SB50; • ($p < 0,05$) vs SB50; + ($p < 0,05$) vs LPS+SB5 e LPS+SB50; ∞ ($p < 0,05$) vs Endógeno; ° ($p < 0,05$) vs GN; # ($p < 0,05$) vs NG (ANOVA).

5.3. Determinação de IL-1 β

A produção endógena da citocina inflamatória IL-1 β 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 β em cultura de PBMC de 18 h em comparação às células cultivadas sem estímulo (endógeno) em todos os grupos estudados. A silibinina nas concentrações de 5 uM e 50 uM inibiu tanto a produção de IL-1 β endógena quanto a estimulada por LPS nos três grupos (Figura 4).

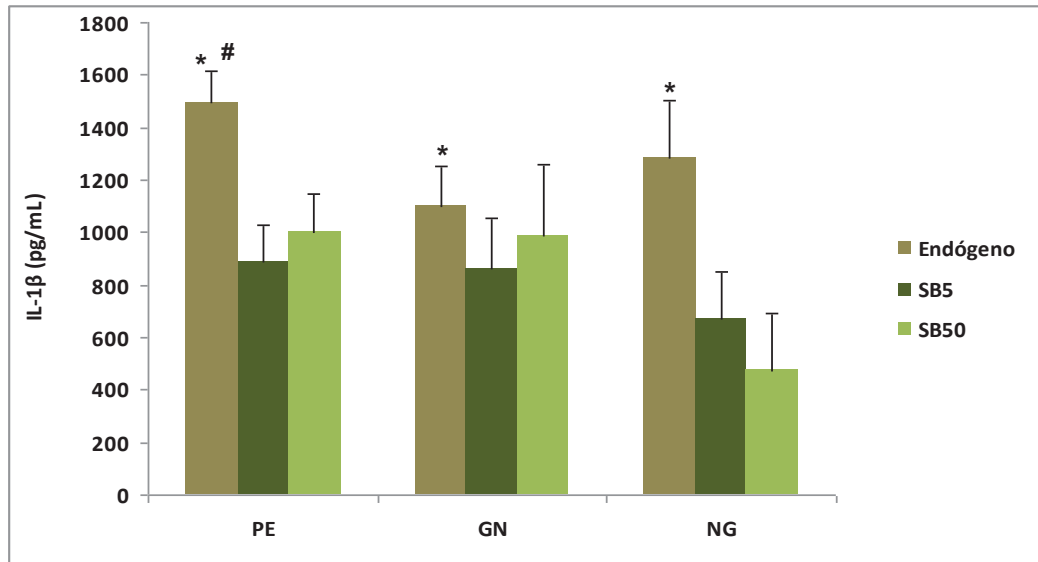


Figura 3. Níveis de IL-1 β em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG), cultivadas sem estímulo e na presença ou ausência de silibinina (SB) nas concentrações de 5uM e 50uM. Os resultados são expressos em média \pm SD.

* ($p < 0,05$) vs SB5 e SB50; # ($p < 0,05$) vs GN (ANOVA).

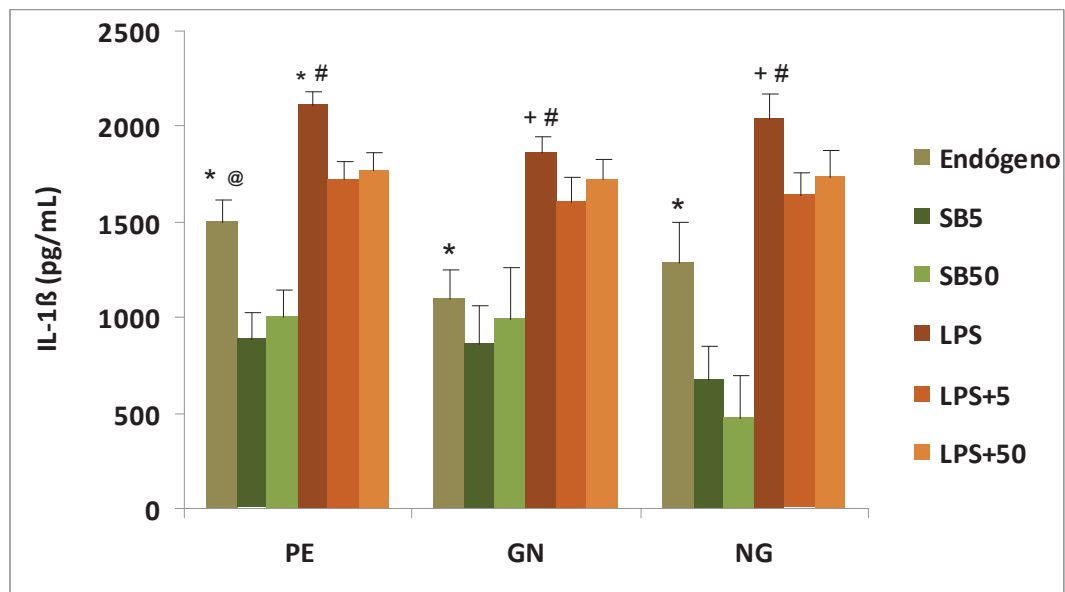


Figura 4. Níveis de IL-1 β em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG), cultivadas na presença ou ausência de silibinina (SB) nas concentrações de 5uM e 50 uM e estimuladas com LPS. Os resultados são expressos em média \pm SD.

* ($p < 0,05$) vs SB5, SB50; + ($p < 0,05$) vs LPS+SB5 e LPS+SB50; # ($P < 0,05$) vs Endógeno; @ ($p < 0,05$) vs GN (ANOVA).

5.4. Determinação de TNF- α

A produção endógena da citocina inflamatória TNF- α foi significativamente maior no grupo PE em comparação aos grupos GN e NG. A incubação das células com silibinina, nas duas concentrações empregadas (5 μ M e 50 μ M) levou à diminuição na produção da citocina nos três grupos estudados (Figura 5).

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. A incubação das células com as duas concentrações de silibinina causou diminuição na produção de TNF- α em todos os grupos estudados (Figura 6).

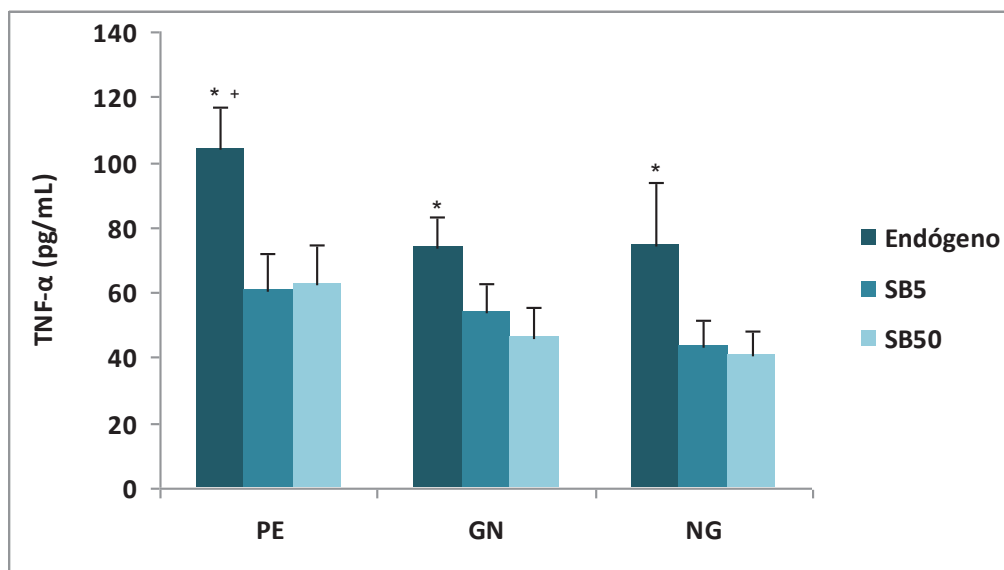


Figura 5. Níveis de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG), cultivadas sem estímulo e na presença ou ausência de silibinina (SB) nas concentrações de 5 μ M e 50 μ M. Os resultados são expressos em média \pm SD.

* ($p < 0,05$) vs SB5 e SB50; + ($p < 0,05$) vs GN; NG (ANOVA).

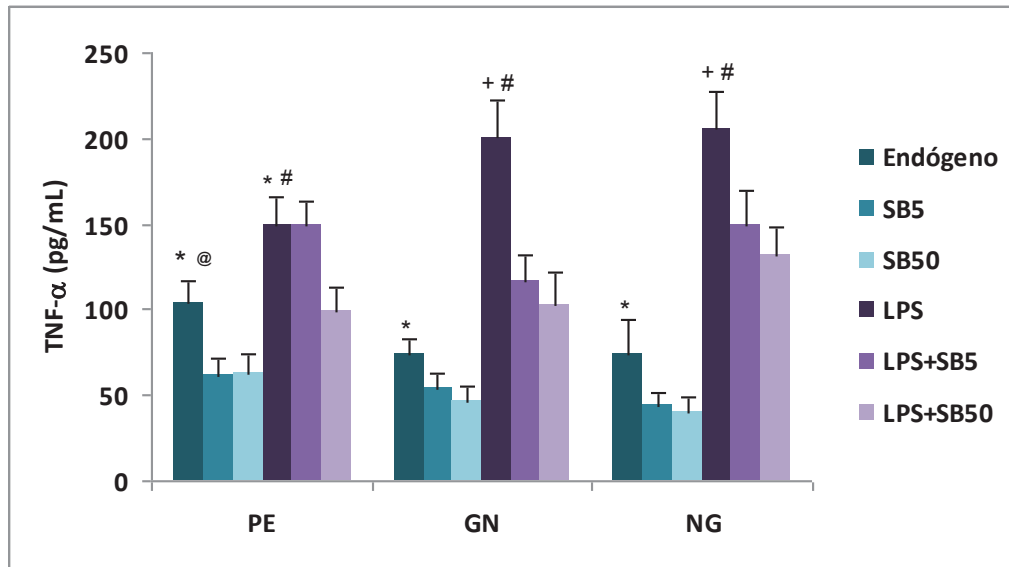


Figura 6. Níveis de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG), cultivadas na presença ou ausência de silibinina (SB) nas concentrações de 5 μ M e 50 μ M e estimuladas com LPS. Os resultados são expressos em média \pm SD.

* ($p < 0,05$) vs SB5 e SB50; + ($p < 0,05$) vs LPS+SB5 e LPS+SB50; # ($P < 0,05$) vs Endógeno;

@ ($p < 0,05$) vs GN, NG (ANOVA).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo avaliou-se o efeito anti-inflamatório da silibinina sobre células mononucleares de sangue periférico de gestantes com pré-eclâmpsia em comparação com as de gestantes saudáveis e de mulheres não-grávidas. O tratamento dessas células com silibinina modulou a ativação de NF- κ B e a produção de citocinas inflamatórias.

Os resultados mostraram que a atividade endógena do fator nuclear NF- κ B foi significativamente mais elevada em PBMC de gestantes portadoras de PE do que em gestantes normotensas (GN). Além disso, a produção espontânea das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α foi significativamente maior nas gestantes com PE, demonstrando que os leucócitos dessas pacientes encontram-se mais ativados.

Alguns autores relatam que a PE está associada com excessivo aumento na ativação da resposta inflamatória, quando comparado com gestantes normotensas (REDMAN & SARGENT, 2004) e, que a via de transdução de sinal do NF- κ B está ativada em PBMC de gestantes com PE quando comparada com grávidas normais e mulheres não-grávidas (LUPPI et al., 2006). 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 da concentração de elastase no sangue periférico. Encontraram aumento dos níveis de expressão de mRNA para NF- κ B-1A, inibidor de NF- κ B, 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. A produção mais elevada de TNF- α e IL-1 β em gestantes com PE, observada no presente trabalho concorda com resultados anteriores de outros autores (BECKMANN et al., 2004) e sugere que, os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes do TNF- α podem estar associados às manifestações mais graves da PE.

Quando PBMC foram estimuladas com LPS observou-se aumento significativo da expressão de NF- κ B em células de gestantes do grupo GN e de mulheres NG. Ao contrário, a expressão nuclear desse fator de transcrição foi significativamente menor no grupo de gestantes com PE. Esses resultados sugerem

que a ativação endógena de PBMC em gestantes com PE interfere com a expressão de NF- κ B, quando as células são submetidas a estímulo com LPS.

De maneira semelhante, o estímulo com LPS levou à produção de TNF- α em todos os grupos, porém, as células das gestantes com PE produziram níveis menores da citocina do que os grupos GN e NG. Considerando que o NF- κ B está envolvido na produção de TNF- α , 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- α poderia levar à menor resposta ao LPS. Esses resultados não foram observados na análise da produção de IL-1 β , havendo maior concordância entre os resultados da expressão de NF- κ B e da produção de TNF- α .

A menor capacidade de produção de TNF- α 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).

Segundo ALBRECHT et al. (2008) diferentes mecanismos de tolerância podem ocorrer em diferentes tipos celulares. A deleção celular é o principal mecanismo envolvendo linfócitos, enquanto em monócitos predomina o bloqueio de sinais de transdução celular. Estudando a tolerância induzida por estimulação repetida com ligantes de TLR2 e TLR4 em células dendríticas, os autores demonstraram que a exposição a esses ligantes torna as células tolerantes em relação à expressão do gene de TNF por um mecanismo que envolve bloqueio do sinal de transdução ao nível de IRAK-1.

A possível tolerância ao LPS em gestantes com PE, com menor produção de TNF- α foi descrita por outros autores (BECKMANN et al., 2004). No presente trabalho, os resultados, permitem sugerir que a ativação prévia das células, com maior ativação do NF-kB e produção endógena elevada de TNF- α , possam ser responsáveis pela tolerância ao LPS quando as células são estimuladas in vitro com a endotoxina. O estímulo in vivo que leva à ativação dos leucócitos em gestantes com PE, permitindo a tolerância ao estímulo com LPS, ainda não é conhecido. Entretanto, tem sido descrito que a resposta inflamatória sistêmica exacerbada na PE parece estar associada com a liberação de substâncias com atividade inflamatória, tais como fragmentos de membranas do sincitiotrofoblasto, DNA fetal solúvel, micropartículas derivadas de leucócitos e citocinas, que ativariam sistemicamente células inflamatórias como monócitos, granulócitos e células endoteliais (KNIGHT et al., 1998; REDMAN & SARGENT, 2004; 2005; BORZYCHOWSKI et al., 2006; GERMAIN et al., 2007; RUSTERHOLTZ et al., 2007; LOK et al., 2009). Além disso, 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).

Esses níveis endógenos de TNF- α e a produção estimulada com LPS detectados em gestantes normais e em gestantes portadoras de PE confirmam pesquisa anteriormente realizada em nosso laboratório, mostrando que monócitos de gestantes com PE encontram-se ativados in vivo, produzindo níveis mais elevados de TNF- α (PERAÇOLI et al., 2007). A concentração de TNF- α no plasma e a produção dessa citocina por monócitos de gestantes hipertensas, avaliadas no terceiro trimestre da gestação e no puerpério, demonstraram que gestantes com PE apresentam níveis plasmáticos de TNF- α e de ácido úrico, significativamente mais elevados em comparação às gestantes normais, havendo correlação entre esses parâmetros.

Níveis elevados de TNF- α 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- α em placentas de pacientes com PE comparado com placentas normais (RINEHART et al., 1999; WANG & WALSH, 1996). Em trabalho anterior, demonstramos que níveis elevados de TNF- α , detectados em homogenatos de placenta de gestantes com PE, estão associados com a gravidade da doença e com os níveis de proteinúria nessas pacientes (PERAÇOLI et al., 2008a). Estes dados sugerem que este aumento de TNF- α pode contribuir para a disfunção endotelial generalizada, característica da PE (CHEN et al., 1996; KHAN et al., 2005). Além disso, SEKI et al. (2007) verificaram que na PE, monócitos ativados produzem altos níveis de TNF- α que induzem apoptose e inibem in vitro, a proliferação de linhagem de células trofoblásticas de maneira dose-dependente, podendo portanto, ser considerada a principal citocina envolvida na patogênese da PE.

A maior ativação de leucócitos na gestação normal e na PE tem sido descrita na literatura (REDMAN et al., 1999; SAITO et al., 2007). Segundo SACKS et al. (1999), na gestação normal há aumento do número de monócitos e granulócitos desde o primeiro trimestre até o final da gestação, ao contrário do sistema imune adaptativo, cuja reatividade encontra-se diminuída durante a gestação. Há evidências de que componentes da imunidade inata estejam ativados sistemicamente, representando um mecanismo de defesa inata contra infecções (SACKS et al., 1999). Portanto, a pré-eclâmpsia parece ser o resultado de uma resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias como monócitos e granulócitos, bem como ativação de células endoteliais, que fazem parte do sistema inflamatório (OIAN et al., 1985; HAEGER et al., 1996; REDMAN et al., 2003). Alterações significativas de leucócitos intravasculares, na gestação normal, levaram REDMAN et al. (1999) a sugerirem que a pré-eclâmpsia pode ser resultante da exacerbação de um processo inflamatório generalizado, natural da gravidez.

Nossos resultados sugerem que o aumento da capacidade de produção das citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-1 β está presente, principalmente em gestantes normais e são parcialmente concordantes com a literatura nesse aspecto. Segundo BREWSTER et al. (2008) a disfunção inflamatória envolvida na fisiopatologia da PE pode ser demonstrada por aumento da capacidade de produção das citocinas IL-1 β ,

IL-2, IL-10, G-CSF, IFN- γ e TNF- α por monócitos estimulados com LPS, contrariando a tradicional dicotomia Th1/Th2 descrita na PE. Entretanto, é importante salientar que o estudo da capacidade de produção de citocinas por monócitos estimulada por LPS nem sempre retrata o estado de ativação dessas células na PE. Nesse sentido, os resultados mais adequados para se correlacionar a gravidade da PE com o perfil, ou o nível de citocinas são os obtidos da produção endógena ou não estimulada dessas células.

Observou-se que o tratamento de PBMC com SB nas duas concentrações empregadas, causou efeito inibidor significativo sobre a expressão de NF- κ B e produção de TNF- α e IL-1 β quando as células foram estimuladas com LPS. A inibição pode ser melhor observada quando os níveis de TNF- α foram elevados, como na produção endógena pelas células de gestantes com PE e na produção estimulada por LPS, nos três grupos.

A atividade anti-inflamatória da SB sobre a produção de TNF- α induzida por LPS já foi demonstrada por trabalho desenvolvido em nosso laboratório. BANNWART *et al.*, (2010a), avaliando o efeito da SB sobre o metabolismo oxidativo de monócitos humanos, obtidos de indivíduos saudáveis, mostraram que esse flavonóide inibe, de maneira dose-dependente, a produção de TNF- α induzida por LPS e a liberação de H₂O₂ por monócitos estimulados com PMA. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a SB atua principalmente inibindo a produção e expressão de TNF- α em humanos e em modelos experimentais (SCHUMANN *et al.*, 2003; AGARWAL *et al.*, 2006; FALASCA *et al.*, 2008; SHANMUGAM *et al.*, 2008; PERAÇOLI *et al.*, 2010).

Estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no efeito anti-inflamatório da SB apontam para um efeito inibidor sobre o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), proteína composta pelas subunidades p50 e p65, capazes de se ligar ao DNA e agir como um fator de transcrição em vários genes envolvidos nos processos inflamatórios, citoprotetores e carcinogênicos (KANG *et al.*, 2002; KREN & WALTEROVÁ, 2005; PRADHAN & GIRISH, 2006). Estudo realizado por LEE *et al.* (2007) mostrou que a SB polariza a resposta Th1/Th2 através da inibição da função imunomodulatória de células dendríticas. A incubação dessas células com o flavonóide suprimiu a expressão das moléculas CD80, CD86, moléculas MHC

classes I e II e IL-12 nessas células. Além disso, a SB inibiu a translocação nuclear da subunidade p65 do NF- κ B nas células estimuladas com LPS. Segundo os autores, as funções imunofarmacológicas da SB poderiam ser úteis no desenvolvimento de terapêutica adjunta para doenças agudas ou crônicas.

Em conjunto, os resultados mais recentes da literatura apontam para um efeito anti-inflamatório e anti-oxidante da SB, principalmente por inibir fatores de transcrição inflamatórios, envolvidos na produção e citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β , IL-2 e TNF- α , liberação de radicais livres do oxigênio e nitrogênio, além de expressão de moléculas envolvidas na resposta inflamatória (SCHUMANN et al., 2003; AGARWAL et al., 2006; PRADHAN & GIRISH, 2006; LEE et al., 2007).

Estudos empregando SB para tratamento de doenças inflamatórias humanas, como cirrose alcoólica e hepatite crônica viral tipo C têm mostrado resultados promissores, na ausência de efeitos colaterais (POLYAK et al., 2007; FALASCA et al., 2008). Em nosso trabalho demonstramos, pela primeira vez, que a silibinina é capaz de inibir a ativação de p65NF- κ B e regular a produção de TNF- α em PBMC de mulheres com pré-eclâmpsia. A silibinina pode ser importante na estabilização da resposta inflamatória desenvolvida pelas mulheres com pré-eclâmpsia. Assim, o emprego desse flavonóide poderia ser importante como terapêutica adjuvante no tratamento das manifestações inflamatórias exacerbadas da pré-eclâmpsia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAN, M.; CINEL, L.; ARSLAN, M.; DILEK, U.; KAPLANOGLU, M.; ARPACI, R.; DILEK, S. Expression of nuclear factor-kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: an immunohistochemical study. *Tohoku J Exp Med.* v. 204, p. 195-202, 2004.

ABENAVOLI, L.; CAPASSO, R.; MILIC, N.; CAPASSO, F. Milk Thistle in Liver Diseases: Past, Present, Future. *Phytother. Res.* v. 24, p. 1423–1432, 2010.

ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med.* v. 35, p. 2408-2416, 2007.

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.* 2002, v. **77**, p. 67–75, 2002.

AGARWAL, R.; AGARWAL, C.; ICHIKAWA, H.; SINGH, R. P.; AGGARWAL, B. B. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res.* v. 26, p. 4457-4498, 2006.

ALBRECHT, V.; HOFER, T. P.; FOXWELL, B.; FRANKENBERGER, M.; ZIEGLER-HEITBROCK, L. Tolerance induced via TLR2 and TLR4 in human dendritic cells: role of IRAK-1. *BMC Immunol.* v. 9, 2008.

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.

BANDMAN, O.; COLEMAN, R. T.; LORING, J. F.; SEILHAMER, J. J.; COCKS, B. G. Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v. **975**, p. 77–90, 2002.

BANNWART, C. F.; PERAÇOLI, J. C.; NAKAIRA-TAKAHAGI, E.; PERAÇOLI, M. T. S. Inhibitory effect of silibinin on tumor necrosis factor-alpha and hydrogen peroxide. *Natural Product Research.* v. 24, p. 1747-1757, 2010a.

BANNWART, C. F.; NAKAIRA-TAKAHAGI, E.; GOLIM, M. A.; MEDEIROS, L. T. L.; ROMÃO, M.; WEEL, I. C.; PERAÇOLI, M. T. S. Downregulation of nuclear factor

kappa B (NF- κ B) pathway by silibinin in human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Life Sciences*; v. 86, p. 880-886, 2010.

BEACH, R. L.; KAPLAN, P. W. Seizures in pregnancy: diagnosis and management. *Internacional Review of Neurobiology*. v. 83, p. 259-271, 2008.

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.

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.

BEGUM, M. R.; AKHTER, S.; BEGUM, A.; KHATUN, M.; QUADIR, E.; CHOUDHURY, S. B. Conservative management of eclampsia and severe preeclampsia-A Bangladesh experience. *Medscape Womens Health*. v. 7; p. 1-4, 2002.

BLACK, R. A.; RAUCH, C. T.; KOZLOSKY, C. J.; PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; WOLFSON, M.F. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* v. 385, p.729-733, 1997.

BÖHRER, H.; QIU, F.; ZIMMERMANN, T.; ZHANG, Y.; JLLMER, T.; MÄNNEL, D.; BÖTTIGER, B. W.; STERN, D. M.; WALDHERR, R.; SAEGER, H. D.; ZIEGLER, R.; BIERHAUS, A.; MARTIN, E.; NAWROTH, P. P. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest*. v. 100, p. 972-985, 1997.

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 25:280-88, 2004.

BORZYCHOWSKI, A. M.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal.Neonatal Med*. v. 11, p. 309-316, 2006.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. v. 97, p. 77-89, 1968.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* v. 214, p. 149-160, 2008.

BREWSTER, J. A.; ORSI, N. M.; GOPICHANDRAN, N.; MCSHANE, P.; EKBOTE, U. V.; WALKER, J. J. Gestational effects on host inflammatory response in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. v. 140, p. 21-26, 2008.

CAPASSO, F.; GAGINELLA, T. S.; GRANDOLINI, G. *Phytotherapy: A Quick Reference to Herbal Medicine*. Springer-Verlag, Berlin., 2003.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* v. 72, p. 3666–3670, 1975.

CASART, Y. C.; TARRAZZI, K.; CAMEJO, M. I. Serum levels of interleukin-6, interleukin-1 β and human chorionic gonadotropin in pre-eclamptic and normal pregnancy. *gynecological Endocrinology*. v. 23, p. 300-303, 2007.

CHEN, C. C.; ROSENBLOOM, C. L.; ANDERSON, D. C.; MANNING, A. M. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation. *J Immunol*. v. 155, p. 3538-3545, 1995.

CHEN, G.; WILSON, R.; WANG, S. H.; ZHENG, H. Z.; WALKER, J. J.; MCKILLOP, J. H. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*. v. 104, p.154-159, 1996.

COLLANGE, O.; LAUNOY, A.; KOPF-POTTECHER, A.; DIETEMANN, J.L.; POTTECHER, T. Éclampsie. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. v. 29, p.75–82, 2010.

COMELLI, M. C.; MENGES, U.; SCHNEIDER, C.; PROSDOCIMI, M. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin, activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. *Integr Cancer Ther*. v. 6, p. 120-129, 2007.

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. The role of the interleukin-1 – receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med*. v. 343, p. 732-734, 2000.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu.Rev. Immunol*. v. 27, p. 519–550, 2009.

DOUGLAS, K.; REDMAN, C. W. Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ*. v. 309, p. 1395–1400, 1994.

DUNN, E.; SIMS, J. E.; NICKLIN, M. J.; O'NEIL, L. A. Annotating genes with potential roles in the immune system: Six new members of the IL-1 family. *Trends Immunol*. v. 22, p. 533–536, 2001.

DUNNE, A.; O'NEILL, L. A. The interleukin-1 receptor/Tolllike receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Science's STKE*, vol. 171, p. re3, 2003.

EDER, C. Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology*. v. 214, p. 543-553, 2009.

FALASCA, K.; UCCIFERRI, C.; MANCINO, P.; VITACOLONNA, E.; DE TULLIO, D.; PIZZIGALLO, E.; CONTI, P.; VECCHIET, J. Treatment with silybin-vitamin E-phospholipid complex in patients with hepatitis C infection. *J Med Virol.* v. 80, p. 1900-1906, 2008.

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.

FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Discovery of TNF-alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies. *Joint Bone Spine.* v. 69, p. 12-18, 2002.

GERMAIN, S. J.; SACKS, G. P.; SOORANA, S. R.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: The role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol.* v. 178, p. 5949-5956, 2007.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kB and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260, 1998.

GOLDBACH-MANSKY, R.; KASTNER, D. L. Autoinflammation: The prominent role of IL-1 in monogenic autoinflammatory diseases and implications for common illnesses. *J Allergy Clin Immunol.* v. 124, p. 1141-1151, 2009.

GUHA, M.; O'CONNEL, M. A.; PAWLINSKI, R.; HOLLIS, A.; McGOVERN, P.; YAN, S. F.; STERN, D.; MACKMAN, N. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression.

HAEGER, M.; UNANDER, M.; ANDERSSON, B.; TARKOWSKI, A.; ARNESTAD, J. P.; BENGTSOM, A. Increased release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in women with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Acta Obstet Gynecol Scand.* v. 75, p. 695-701, 1996.

HAIDER, S.; KNÖFLER, M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta,* v. 30, p. 111-123, 2009.

HASEGAWA, K.; ICHIYAMA, T.; ISUMI, H.; NAKATA, M.; SASE, M.; FURUKAWA, S. NF-kB activation in peripheral blood mononuclear cells in neonatal asphyxia. *Clin Exp Immunol.*; v. 132, p. 261-64, 2003.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared principles in NF-kB signaling. *Cell* 132:344-62, 2008.

HOFFMANN, E.; THIEFES, A.; BUHROW, D.; DITTRICH-BREIHOLZ, O.; SCHNEIDER, H.; RESCH, K.; KRACHT, M. MEK1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-kappaB-mediated interleukin-8

transcription in response to cytokines or growth factors. *J. Biol. Chem.* v. **280**, p. 9706–9718, 2005.

HOLZBERG, D.; KNIGHT, C. G.; DITTRICH-BREIHOLZ, O.; SCHNEIDER, H.; DÖRRIE, A.; HOFFMANN, E.; RESCH, K.; KRATCH, M. Disruption of the c-JUN/JNK complex by a cell-permeable peptide containing the c-JUN delta domain induces apoptosis and affects a distinct set of interleukin-1-induced inflammatory genes. *J. Biol. Chem.* v. 278, p. 40213–40223, 2003.

HSU, H.; HUANG, J.; SHU, H. B.; BAICHWAL, V.; GOEDDEL, D. V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* v. 4, p. 387–396, 1996.

HUANG, T. T.; MIYAMOTO, S. Postrepression activation of NF- κ B requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I κ B α . *Mol Cell Biol* 21: 4737–4747, 2001.

HUPPERTZ, B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*. v. 51, p. 970-975.

JIANG, Y.; WORONICZ, J. D.; LIU, W.; GOEDDEL, D. V. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* v. 283, p. 543–546, 1999.

JOHNSON, V. J.; OSUCHOWSKI, M. F.; HE, Q.; SHARMA, R. P. Physiological responses to a natural antioxidant flavonoids mixture, silymarin, in BALB/c mice: II. Alterations on thymic differentiation correlate with changes in *c-myc* gene expression. *Planta Med.* v. 68, p. 961-965, 2002.

JONSSON, Y.; RUBER, M.; MATTHIESEN, L.; BERG, G.; NIEMINEN, K.; SHARMA, S.; ERNERUDH, J.; EKERFELT, C. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol.* v. 70, p. 83–91, 2006.

KALINDERIS, M.; PAPANIKOLAOU, A.; KALINDERI, K.; IOANNIDOU, E.; GIANNOULIS, C.; KARAGIANNIS, V.; TARLATZIS, B. C. Elevated Serum Levels of Interleukin-6, Interleukin-1 β and Human Chorionic Gonadotropin in Pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* v. 65, p. 1-8, 2011.

KANG, J. S.; JEON, Y. J.; KIM, H. M.; HAN, S. H.; YANG, K. H. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 302, p. 138-144, 2002.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13:460–69, 2007.

KHAN, F.; BELCH, J. J.; MACLEOD, M.; MIRES, G. Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops. *Hypertension*. v. 46, p. 1123-1128, 2005.

KNIGHT, M.; REDMAN, C. W.; LINTON, E. A.; SARGENT, I. L. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* v. 105, p. 632-40, 1998.

KREN, V.; WALTEROVA, D. Silybin and silymarin, new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* v. 149, p. 29-41, 2005.

KUNO, K.; MATSUSHIMA, K. The IL-1 receptor signaling pathway. *Journal of Leukocyte Biology.* v. 56, p. 542-547, 1994.

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.

LEE, J. S.; KIM, S. G.; KIM, H. K.; LEE, T. H.; JEONG, Y. I.; LEE, C. M.; YOON, M. S.; NA, Y. J.; SUH, D. S.; PARK, N. C.; CHOI, I. H.; KIM, G. Y.; CHOI, Y. H.; CHUNG, H. Y.; PARK, Y. M. Silibinin polarizes Th1/Th2 immune responses through the inhibition of immunostimulatory function of dendritic cells. *J Cell Physiol.* v. 210, p. 385-397, 2007.

LOCKWOOD, C. J.; HUANG, S. J.; KRIKUN, G.; CAZE, R.; RAHMAN, M.; BUCHWALDER, L. F.; FREDERICK, S. Decidual Hemostasis, Inflammation, and Angiogenesis in Pre-Eclampsia. *Semin Thromb Hemost.* v. 37, p. 158-164, 2011.

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.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, Y.; WAHL, L. M. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol.* v. 175, p. 5423-5429, 2005.

LUPPI, P.; DELOIA, J. A. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.* v. 118, p. 268-275, 2006.

MAINE, G. N.; MAO, X.; KOMARCK, C. M.; BURSTEIN, E. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *EMBO J* 26: 436-477, 2007.

MARTINEZ-BORRA, J.; LOPEZ-LARREA, C.; GONZALEZ, S.; FUENTES, D.; DIEGUEZ, A.; DESCHAMPS, E. M. High serum tumor necrosis factor-alpha levels are associated with lack of response to infliximab in fistulizing Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* v. 97, p. 2350-2356, 2002.

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.

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.

NETEA, M. G.; NOLD-PETRY, C. A.; NOLD, M. F.; JOOSTEN, L. A.; OPTIZ, B.; VAN DER MEER, J. H.; VAN DE VEERDONK, F. L.; FERWERDA, G.; HEINHUIS, B.; DEVESA, I.; FUNK, C. J.; MASON, R. J.; KULLBERG, B. J.; RUBARTELLI, A.; VAN DER MEER, J.W.; DINARELLO, C. A. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* v.113, p. 2324–2335, 2009.

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.

OIAN, P.; OMSJO, I.; MALTAU, J. M.; OSTERUD, B. Increased sensitivity to tromboplastin synthesis in blood monocytes from pre-eclamptic patients. *Br J Obstet Gynecol.* v. 92, p. 511-517, 1985.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* v. 20, p. 87–103, 2010.

PERAÇOLI, J. C.; RUDGE, M. V.; PERAÇOLI, M. T. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* v. 57, p. 177-185, 2007.

PERAÇOLI, M. T. S.; LOURENÇO, N. C. V.; CRISTOFALO, R.; NAKAIRA-TAKAHAGI, E.; BANNWART, C. F.; PERAÇOLI, J. C. Cytokines and pro and anti-angiogenic factors in placenta of pregnant women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* v. 27, p.430, 2008a.

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, J. C.; WEEL, I. C.; BANNWART, C. F.; ROMÃO, M.; NAKAIRA-TAKAHAGI, E.; MEDEIROS, L. T. L.; SILVA, M. G.; PERAÇOLI, M. T. S. Hepatoprotective effects of silibinin on experimental preeclampsia induced by L-NAME is associated with reduction in inflammatory cytokines levels. *Preg Hypertens: Int J Women,s Card Health.* v. 1, p. S49-S50, 2010.

PERAÇOLI, M. T. S.; 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. *American Journal of Reproductive Immunology*. v. 65, p. 1-8, 2011.

POLYAK, S. J.; MORISHIMA, C.; SHUHART, M. C.; WANG, C. C.; LIU, Y.; LEE, D. Y. Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. *Gastroenterology*. v. 132, p. 1925-1936, 2007.

PRADHAN, S. C.; GIRISH, C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res*. v. 124, p. 491-504, 2006.

QU, Y.; Franchi, L.; NÚÑEZ, G.; DUBYAK, G.R. Nonclassical IL-1b secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J. Immunol*. v. 179, p. 1913–1925, 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. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol*. v. 24, p. 565-570, 2004.

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. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 89, p. 104–117, 2011.

ROSS, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. v. 340, p. 115–126, 1999.

ROSS, S. M. Milk thistle (*Silybum marianum*): an ancient botanical medicine for modern times. *Holist Nurs Pract*. v. 22, p. 299–300, 2008.

RUI, Y. C. Advances in pharmacological studies of silymarin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 86, p. 79-85, 1991.

RUSTERHOLZ, C.; HAHN, S.; HOLZGREVE, W. Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. *Semin Immunopathol*. v. 29, p. 151-162, 2007.

SACKS, G. P.; STUDENA, K.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. G. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* v. 179, p. 80-86, 1998.

SACKS, G.; SARGENT, I.; REDMAN, C. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today.* v. 20, p. 114-118, 1999.

SAITO, S.; SAKAI, M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol.* v. 59, p. 161-173, 2003.

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.

SALIOU, C.; RIHN, B.; CILLARD, J.; OKAMOTO, T.; PACKER, L. Selective inhibition of NF- κ B activation by the flavonoid hepatoprotector silymarin in HepG2. *FEBS Lett.* v.440, p. 8-12, 1998.

SALLER, R.; MEIER, R.; BRIGNOLI, R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* v. 61, p. 2035-2063, 2001.

SAUDAN, P.; BROWN, M. A.; BUDDLE, M. L.; JONES, M. Does gestational hypertension become pre-eclampsia? *Br J Obstet Gynaecol.* v. 105, p. 1177-1184, 1998.

SCHÜMANN, J.; PROCKL, J.; KIEMER, A. K. 2003. Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. *J Hepatol.* v. 39, p. 333-340, 2003.

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.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921-928, 1986.

SEN, R.; SMALE, S. T. Selectivity of the NF- κ B response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000257, 2009.

SHANMUGAM, K.; HOLMQUIST, L.; STEELE, M.; STUCHBURY, G.; BERBAUM, K.; SCHULZ, O.; BENAVENTE GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; BURNELL, J.; GARCIA RIVAS, V.; DOBSON, G.; MÜNCH, G. Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. *Mol Nutr Food Res.* v. 52, p. 427-438, 2008.

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.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* v. 132, p. 2169-2180, 2007.

- SIBAI, B. M.; RAMADAN, M. K.; USTA, I.; SALAMA, M.; MERCER, B. M.; FIEDMAN, S. A. Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *Am J Obstet Gynecol.* v. 169, p. 1000-1006, 1993.
- SINGH, R. P.; AGARWAL, R. Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer. *Antioxid Redox Signal* v. 4, p. 655–663, 2002.
- SINGH, R. P.; AGARWAL, R. Cosmeceuticals and silibinin. *Clin Dermatol.* v. 27, p. 679-484, 2009.
- SINGH, R. P.; DHANALAKSHMI, S.; TYAGI, A. K. Dietary feeding of silibinin inhibits advance human prostate carcinoma growth in athymic nude mice and increases plasma insulin-like growth factorbinding protein-3 levels. *Cancer Res* v. 62, p. 3063–3069, 2002.
- SINGH, R. P.; MALLIKARJUNA, G. U.; SHARMA, G.; DHANALAKSHMI, S.; TYAGI, A. K.; CHAN, D. C.; AGARWAL, C.; AGARWAL, R. Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor kappaB-mediated inducible chemoresistance. *Clin Cancer Res.* v. 10, p. 8641-8647, 2004.
- SINGH, R. P.; AGARWAL, R. Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer. *Eur J Cancer* v. 41, p. 1969–1979, 2005.
- SINGH, R. P.; DEEP, G.; CHITTEZHATH, M. Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *J Natl Cancer Inst.* v. 98, p. 846–855, 2006.
- SPRIGGS, D. R.; DEUTSCH, S.; KUFEL, D. W. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol Ser.* v. 56, p. 33–34, 1992.
- 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.
- TANAKA, T.; GRUSBY, M. J.; KAISHO, T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kB activation by intranuclear sequestration and degradation of the 65 subunit. *Nat Immunol* 8: 584–591, 2007.
- TANG, P.; HUNG, M. C.; KLOSTERGAARD, J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* v. 35, p. 8216–8225, 1996.
- TOBIUME, K.; MATSUZAWA, A.; TAKAHASHI, T.; NISHITOH, H.; MORITA, K.; TAKEDA, K. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* v. 2, p. 222–228, 2001.

TOSUN, M.; CELIK, H.; AVCI, B.; YAVUZ, E.; ALPER, T.; MALATYALIOĞLU, E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* v. 23, p. 880-886, 2010.

TROGSTAD, L.; MAGNUS, P.; STOLTENBERG, C. Pre-eclampsia: risk factor and causal models. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 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.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27:693-733, 2009.

VAN DER POLL, T.; VAN DEVENTER, S. J. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am.* v. 13, p. 413-426, 1999.

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, L.; DU, F.; WANG, X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* v. 133, p. 693–703, 2008.

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.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 β (IL-1 β) processing pathway. *Science Signaling.* v. 3, p. 1-2, 2010.

WENEKE, U.; EARL, J.; SEYDEL, C. Potential health risk of complementary alternative medicines in cancer patients. *Br J Cancer.* v. 90, p. 408-413, 2004.

WILSON, K. P.; BLACK, J.-A. F.; THOMSON, J. A.; KIM, E. E.; GRIFFITH, J. P.; NAVIA, M. A.; MURCKO, M. A.; CHAMBERS, S. P.; ALDAPE, R. A.; RAVBUCK, S. A.; LIVINGSTON, D. J. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* v. 370, p. 270–275, 1994.

YANG, J.; LIN, Y.; GUO, Z.; CHENG, J.; HUANG, J.; DENG, L. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation. *Nat Immunol* v. 2, p. 620–624, 2001.

ZANDI, E.; ROTHWART, D. M.; DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; KARIN, M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, I κ B α and I κ B β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell*. v. 91, p. 243-252, 1997.

8. ANEXO A:



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de março de 2.010

OF. 049/2010-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof.^a Tit. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Departamento de Microbiologia e Imunologia do
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezada Dr.^a Terezinha,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3443-2010) "Efeito da silibinina sobre o fator de transcrição nuclear-kappaB e produção de citocinas inflamatórias por células mononucleares de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia", a ser conduzido por Vanesa Silvestre Innocenti Giorgi, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração do Prof. Titular José Carlos Peraçoli e de Camila Ferreira Bannwart, recebeu do relator parecer favorável com sugestão, aprovado em reunião de 01 de março de 2.010.

Sugestão: "Favor excluir do TCLE das doadoras voluntárias a frase "Estou ciente que a doação deste volume de sangue não trará riscos a minha saúde"

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP