



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

MARIANA LETICIA MATIAS

**Efeito modulador da progesterona, vitamina D e silibinina
sobre inflamações em monócitos de gestantes
portadoras de pré-eclâmpsia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientadora: Prof^a. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

**Botucatu
2019**

MARIANA LETICIA MATIAS

Efeito modulador da progesterona, vitamina D e silibinina sobre inflamassomas em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientadora: Prof^a. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Matias, Mariana Leticia.

Efeito modulador da progesterona, vitamina D e silibinina sobre inflamações em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Mariana Leticia Matias. - Botucatu, 2019

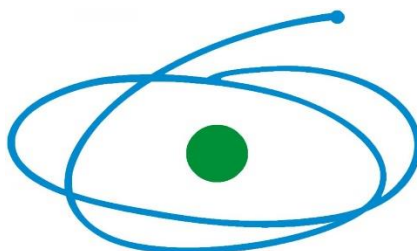
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Capes: 40101150

1. Monócitos. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Progesterona. 4. Vitamina D.

Palavras-chave: Monócitos; Pré-eclâmpsia; Progesterona; Silibinina; Vitamina D.

Financiamento:



C A P E S

Bolsa CAPES – Doutorado: Período de vigência: março/2015 – junho/2016



Bolsa FAPESP – Doutorado: Processo nº 2015/26147-3
Período de vigência: julho/2016 – fevereiro/2019

Auxílio regular à Pesquisa: Processo nº 2016/18155-9
Período de vigência: fevereiro/2017 – janeiro/2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, José Carlos e Elisabete, por todo amor e confiança que sempre tiveram por mim. Vocês são um exemplo de luta, trabalho e perseverança para mim.

Dedico esse trabalho ao meu papai, pois passei pelo pior momento da minha vida durante meu Doutorado ao descobrir que ele estava doente. A ideia de perdê-lo me desestabilizou, mas jamais perdi a Fé. Como o homem corajoso e forte que sempre foi e graças ao nosso querido Deus e à Nossa Senhora, que nunca nos desampara, ele conseguiu superar e vencer essa terrível doença com bravura e leveza no coração.

Também dedico esse trabalho à minha amada mamãe, que nunca deixou de acreditar no meu potencial. Sempre forte para me amparar nas horas mais difíceis e me lembrando todos os dias que eu sou capaz e posso conquistar tudo aquilo que almejo. Mãe, você é a mulher mais forte e corajosa que eu já conheci. Tenho muito orgulho de ser sua filha.

**Minha eterna gratidão.
Amo vocês!**

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por toda sabedoria, atenção e amor pelo que faz. Sou grata por tudo que a senhora fez por mim ao longo de todos esses anos. Uma grande mulher, com um coração e uma generosidade imensa. Sempre compreensível, preocupada com nosso futuro e bem-estar, tanto profissional quanto pessoal. Não tenho palavras para descrever como sou grata e como sentirei falta da senhora no meu dia-a-dia.

Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que guiou os meus caminhos para chegar até aqui.

Aos meus avós, Carlos e Zilda, que são o alicerce e a base da minha família. Sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida e não se cansam de demonstrar o orgulho que tem por todos os netos.

Ao meu querido irmão Maurício, pelo apoio que me deu e por sempre me encorajar a seguir adiante, mesmo apesar dos meus medos.

Às minhas amigas e irmãs do Lab. 3, Vanessa, Mariana, Priscila, Amanda e Virgínia, por toda ajuda e momentos de descontração. Meus dias nunca mais serão os mesmos sem vocês. O melhor ambiente de trabalho que eu poderia ter. Ter que partir faz meu coração chorar, mas levo a certeza de que terei sempre vocês no meu pensamento e na minha vida.

À minha grande amiga Renata, por sempre me compreender, me aconselhar e me acompanhar em todos os momentos da minha vida. Amiga para todas as horas, nunca me deixou experimentar a solidão.

Às minhas amigas Carolina e Isabel, pelos longos anos de amizade, cumplicidade e por todos os momentos de sorrisos e alegria. Essa amizade verdadeira me encoraja, todos os dias, a acreditar que existem anjos ao nosso redor para amenizar nossa árdua jornada aqui na Terra.

Ao professor Ramon, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, que disponibilizou o seu laboratório e à Dr^a. Graziela, por me auxiliar na elaboração de uma parte fundamental do meu trabalho e por destinar o seu tempo para participar dessa pesquisa.

Aos docentes, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por toda ajuda, boa convivência e almoços inesquecíveis na copa do Depto.

Ao Dr. José Carlos Peraçoli, Dr^ª. Vera e aos demais docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela cuidadosa seleção das pacientes e por sempre estarem disponíveis a me ajudar.

Aos funcionários da Unidade Básica de Saúde da Cecap, Botucatu, pela atenção e auxílio disponibilizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, por possibilitar a realização deste trabalho e aos funcionários (em especial, à querida Solange) pela disponibilidade, atenção, simpatia, gentileza e eficiência em todas as necessidades.

À CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho e que, principalmente, contribuíram para a formação da pessoa que sou hoje.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”

Chico Xavier

PREFÁCIO

A tese intitulada “Efeito modulador da progesterona, vitamina D e silibinina sobre inflamassomas em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia” encontra-se dividida em 5 capítulos.

Inicialmente, o primeiro capítulo da tese traz uma breve introdução a respeito da patogênese da pré-eclâmpsia e suas manifestações clínicas. Também é rapidamente abordado o papel de cristais de ácido úrico (urato monossódico) e hialurona, moléculas conhecidas como “sinais de perigo” ou alarminas, que estão envolvidas no desencadeamento da inflamação estéril presente nessa doença.

O capítulo dois apresenta o manuscrito “Silibinin downregulates the NF- κ B pathway and NLRP1/NLRP3 inflammasomes in monocytes from pregnant women with preeclampsia”, submetido à publicação para a revista *Molecules*. Nesse manuscrito, relatamos o papel do flavonoide silibinina na modulação das vias do TLR4/MyD88/NF- κ B, dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 e na diminuição da produção de citocinas inflamatórias por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia. Essas vias, presentes em células da imunidade inata e ativadas em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, são responsáveis pela inflamação estéril observada nessa patologia. Sendo assim, o papel regulador da silibinina parece ter grande importância como possível forma terapêutica no controle da pré-eclâmpsia.

O capítulo três apresenta o manuscrito intitulado “Efeito modulador da progesterona sobre as vias dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 e TLR4/MyD88/NF- κ B em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e em células THP-1”, que será submetido à publicação em breve. Esse artigo apresenta o papel modulador da progesterona sobre a inflamação sistêmica exacerbada observada na pré-eclâmpsia. Sendo um importante hormônio da gestação, a progesterona foi capaz de diminuir a expressão gênica de componentes inflamatórios presentes nas vias do NF- κ B e dos inflamassomas NLRP1/NLRP3, responsáveis pela inflamação estéril anormal presente nessa doença. Dessa forma, é possível concluir que a progesterona pode ser um hormônio promissor no futuro tratamento da PE.

O capítulo quatro apresenta o manuscrito intitulado “Tratamento *in vitro* com vitamina D regula as vias TLR4/MyD88/NF- κ B e dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e em células THP-1”, que também será enviado para publicação em breve. Nesse manuscrito, evidenciamos a

capacidade da vitamina D em imunomodular importantes vias inflamatórias presentes em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia. Essas gestantes apresentam níveis plasmáticos mais baixos de vitamina D em comparação com gestantes normotensas, o que pode estar relacionado à incapacidade do organismo materno em conter essa inflamação descontrolada. Sendo assim, sugerimos que a vitamina D pode ter papel regulador sobre a inflamação sistêmica exacerbada observada na PE.

O capítulo cinco contém os anexos referentes aos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e ao Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alexa Fluor 647: fluorocromo alexa fluor 647

AlexaFluor 488: fluorocromo alexa fluor 488

CD: *cluster of differentiation*

CD14: *cluster of differentiation 14*, molécula marcadora de monócitos

cDNA: DNA complementar

Células Th: células T helper

CO₂: dióxido de carbono

DAMPs: padrões moleculares associados ao dano

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

FL: fluorescência

FSC: *foward scatter*, parâmetro de tamanho

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HA: hialurona

HMGB1: *High mobility group box 1 protein*

HMW-HA: *High Molecular Weight – Hyaluronan*

Hsp: proteína de choque térmico

HUVEC: células endoteliais humanas de veia umbilical

IFN- γ : interferon gama

IKK: complexo enzimático quinase

IL: interleucina

I κ B α : *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha*

LMW-HA: *Low Molecular Weight - Hyaluronan*

LPS: lipopolissacarídeo

MIF: média de intensidade de fluorescência

mRNA: RNA mensageiro

MSU: urato monossódico

MyD88: fator de diferenciação mielóide 88

NF- κ B: fator nuclear kappa B

NLR: receptor do tipo NOD

NLRP: *NLR family, pyrin domain containing*

NT: normotensa

PA: pressão arterial

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PBMCs: células mononucleares do sangue periférico

PBS: tampão-fosfato salino

PE: fluorocromo ficoeritrina

PE: pré-eclâmpsia

PE-Cy7: fluorocromo ficoeritrina conjugado com corante cianina

PG: progesterona

PMSF: fluoreto de fenilmetano

PRRs: receptores de reconhecimento padrão

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

rpm: rotação por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*, meio sintético complexo

SB: silibinina

SSC: *side scatter*, parâmetro de granularidade

TGF- β 1: fator transformador do crescimento beta 1

THP-1: linhagem celular de monócitos humanos

TLR4: receptor do tipo Toll 4

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UVB: ultravioleta

VD: vitamina D

Sumário

Capítulo I.....	18
Capítulo II.....	32
Capítulo III.....	47
Capítulo IV.....	87
Capítulo V.....	124

CAPÍTULO I

1. Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez, que ocorre em 2 a 10% das gestações, sendo a principal causa de morbimortalidade materna e perinatal. O diagnóstico clínico é feito a partir da vigésima semana de gravidez ou nos primeiros dias após o parto, fundamentando-se no desenvolvimento de hipertensão arterial (PA \geq 140x90mmHg) com a presença ou não de proteinúria (\geq 300mg/24h) (ACOG, 2019), além de outras manifestações clínicas maternas, como insuficiência renal, comprometimento hepático, alterações neurológicas ou hematológicas, disfunção útero-placentária e restrição de crescimento fetal (Tranquilli et al., 2014; Mol et al., 2015).

A PE se caracteriza por intensa reação inflamatória sistêmica, lesão endotelial, agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação e aumento da resistência vascular generalizada (Roberts, 1998; Borzychowski et al., 2006), que parecem contribuir significativamente para a fisiopatologia da doença (Redman & Sargent, 2005). Assim, na PE ocorre ativação de células inflamatórias, como monócitos, granulócitos e células endoteliais (Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006), produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (Johnson et al., 2002; Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007), bem como alterações na produção de citocinas reguladoras, como IL-10, importante fator regulador da resposta inflamatória (Cristofalo et al., 2013).

O predomínio de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, na gestação normal minimiza os efeitos deletérios da resposta inflamatória excessiva, inibindo a produção de IL-1 β e TNF- α por monócitos ativados (Moore et al., 2001). Porém na PE, essa regulação está prejudicada, observando-se diminuição de IL-10 e aumento de TNF- α (Marzi et al., 1996). Em trabalho anterior demonstramos que, monócitos de gestantes pré-eclâmplicas produzem concentrações endógenas de IL-10 significativamente menores do que os de gestantes normotensas, enquanto os valores de TNF- α encontram-se elevados (Cristofalo et al., 2013), corroborando os achados da literatura (Azizieh et al., 2005).

A resposta inflamatória sistêmica exacerbada na PE está relacionada com a liberação de substâncias capazes de induzir inflamação, como fragmentos de membranas do sincitiotrofoblasto, DNA fetal, micropartículas solúveis derivadas de

leucócitos e citocinas inflamatórias, presentes no plasma das gestantes, que ativam células da imunidade inata (Redman & Sargent, 2004; Borzychowski et al., 2006; Lok et al., 2009). Além disso, produtos endógenos celulares liberados durante lesão tecidual e denominados “sinais de perigo” ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Kim et al., 2005) podem estar presentes no plasma das gestantes e são considerados importantes moduladores da resposta inflamatória. As DAMPs são representadas por moléculas como ácido úrico, reativos intermediários do oxigênio, proteínas de choque térmico (Asea et al., 2002), proteínas liberadas de células mortas como *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) (Park et al., 2004) e produtos liberados da matriz extracelular, como fibronectina e hialurona (Yamasaki et al., 2009; Campo et al., 2010, Saïd-Sadier & Ojcius, 2012).

Hiperuricemia está presente em muitas pacientes com PE e se correlaciona com proteinúria elevada e a gravidade da doença (Costa et al., 2012). Segundo Bainbridge & Roberts (2008), o ácido úrico tem potencial de promover inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial. Nesse sentido, observou-se correlação positiva entre o aumento da produção da citocina inflamatória TNF- α , de O₂⁻ e concentração sérica elevada de ácido úrico em mulheres com PE (Peraçoli et al., 2011). Também foi detectada associação entre concentração plasmática elevada de ácido úrico, proteína de choque térmico Hsp70, IL-1 β , IL-12 e TNF- α nos casos graves dessa doença (Peraçoli et al., 2013).

O hialurona é um glicosaminoglicano e o principal componente da matriz extracelular, que é liberado durante lesão e inflamação teciduais, resultando em acúmulo de fragmentos com baixo peso molecular (LMW-HA). Esses fragmentos ativam a resposta pró-inflamatória, agindo como DAMPs por interação com receptores TLRs, indução de citocinas pró-inflamatórias e ativação do inflamassoma NLRP3 por leucócitos (Yamazaki et al., 2009; Campo et al., 2010; Ruppert et al., 2014) (Figura 1).

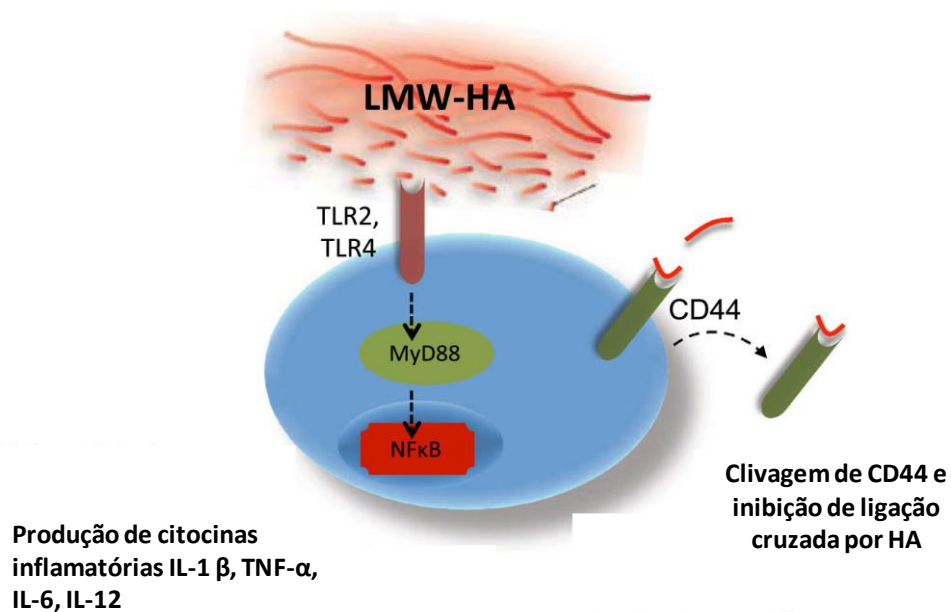


Figura 1. Ação pró-inflamatória de hialurona de baixo peso molecular (LMW-HA). LMW-HA atua como agonista da sinalização TLR através de interação com TLR2 e/ou TLR4 e ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias por leucócitos. Além disso, induz *turnover* de CD44, limitando a probabilidade de ligação cruzada de CD44 por HA de matriz extracelular intacta. Figura adaptada de Ruppert et al. *Immunology Research*, 2014; 58:186-192.

Por outro lado, o hialurona de alto peso molecular (HMW-HA) gera resposta anti-inflamatória por interação com o receptor CD44 presente na superfície celular, contribuindo para a resolução da inflamação e homeostase imunológica (Taylor et al., 2004; Scheibner et al., 2006; Stern et al., 2006; Ruppert et al., 2014) (Figura 2). Romão et al. (2014) demonstraram que o hialurona está aumentado no plasma de gestantes com PE em comparação com gestantes normotensas. Estudo envolvendo gestantes com eclâmpsia e PE grave demonstrou que o hialurona está aumentado no plasma dessas pacientes (Berg et al. 2001), enquanto Uzun et al. (2010) observaram concentrações aumentadas de hialurona no sangue do cordão umbilical e na placenta de gestantes pré-eclâmplicas.

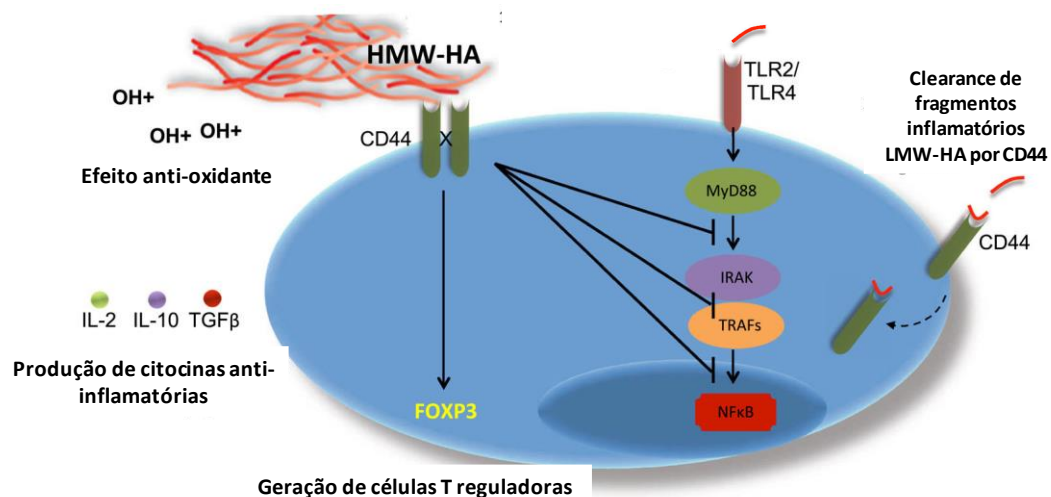


Figura 2. Ação anti-inflamatória de hialurona de alto-peso molecular (HMW-HA). HMW-HA e CD44 regulam negativamente a sinalização pró-inflamatória de TLR pela depuração de LMW-HA pró-inflamatório, tem ação anti-oxidante contra radicais livres gerados em locais de inflamação, induz a ligação cruzada de CD44 por HMW-HA promovendo a produção de citocinas anti-inflamatórias pelas células e a estabilidade fenotípica de células T reguladoras. Figura adaptada de Ruppert et al. Immunology Research, 2014; 58:186-192.

2. Papel dos “sinais de perigo” - DAMPs

Produtos endógenos celulares liberados durante lesão tecidual denominados padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou “sinais de perigo” como o ácido úrico, hialurona, proteínas de choque térmico (HSPs), citocinas inflamatórias (IL-1β, HMGB1), entre outros, são estruturas moleculares associadas ao estresse e morte celular e podem se ligar aos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos em células da imunidade inata, ativando a resposta imune inflamatória que contribui diretamente para a patogênese da PE (Figura 3). Esses receptores são considerados componentes centrais do sistema imune inato e estão envolvidos na resposta inflamatória de monócitos (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Os principais são os receptores semelhantes ao *Toll* (TLRs), que reconhecem e ligam DAMPs (Kim et al., 2005) e também moléculas presentes na superfície de patógenos conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Koga & Mor, 2008).

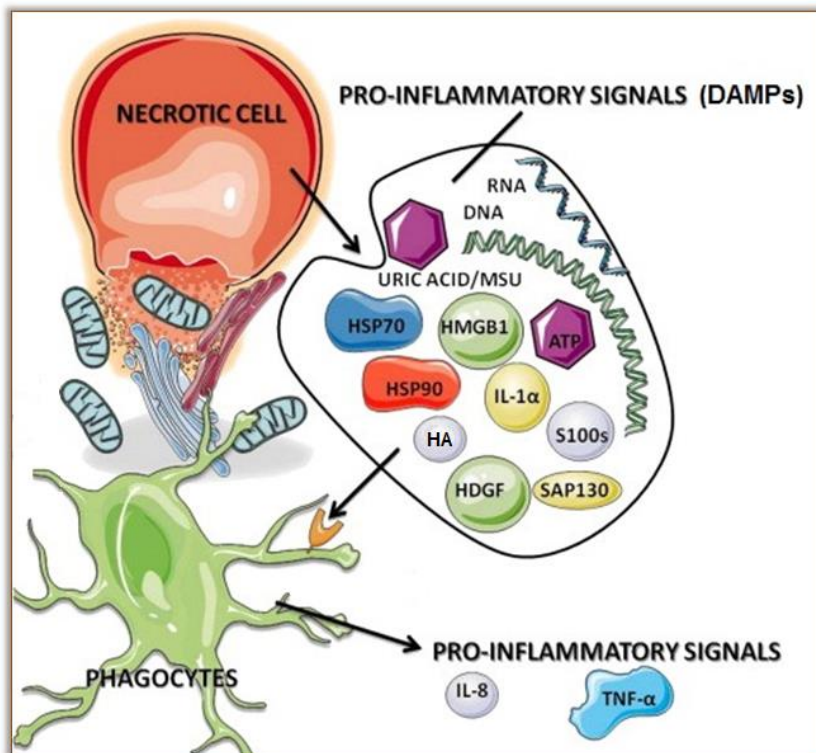


Figura 3. Imunologia da morte celular necrótica. As células necróticas liberam organelas intracelulares, bem como fatores intracelulares como ácido úrico/MSU, HSP70, HSP90, HMGB1, ATP, DNA, RNA, HDGF e membros da família das proteínas SAP130 e S100. Além disso, as células necróticas secretam IL-1 α e IL-6 de maneira passiva e ativa. Esses fatores pró-inflamatórios atraem a atenção das células fagocíticas e interagem com seus receptores de superfície. Em seguida, os fagócitos secretam sinais pró-inflamatórios como IL-8 e TNF- α , induzindo uma resposta inflamatória de magnitude considerável. Figura adaptada de Garg et al., 2010.

Outros receptores PRRs compreendem os membros da família de receptores Nod-like ou NLR (proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica), que são proteínas citosólicas capazes de reconhecer PAMPs e DAMPs citoplasmáticos e recrutar outras proteínas, formando complexos de sinalização que promovem a inflamação. Esses complexos de sinalização são chamados inflamassomas e geram formas ativas de IL-1 β (Abbas et al., 2012). A ligação de lipopolissacáride (LPS), ácido lipoteicóico, flagelina, cristais de ácido úrico como o urato monossódico (MSU), entre outros PAMPs e DAMPs, ativam receptores NLR, incluindo NLRP1, NLRP3 e NLRC4, que são responsáveis pela formação do inflamassoma (Lamkanfi et al., 2007). NLRP1 e NLRP3 são expressos em células imunes, mas também em outros tipos celulares como células placentárias (Abrahams, 2011; Pontillo et al., 2013).

A ativação do inflamassoma NLRP3 é importante para a defesa do hospedeiro e eliminação de patógenos como fungos, bactérias e vírus, sendo os produtos de sua

ativação, IL-1 β e IL-18, moléculas protetoras em várias infecções (Dinarello & Fantuzzi, 2003; Dinarello, 2009). Também é ativado em condições de estresse ou lesão celular (Yang et al., 2012).

A interação com as DAMPs pode ativar diversas vias, sendo a resposta inflamatória induzida pela via de sinalização TLR4 considerada uma das mais importantes na patogênese da PE (Kim et al., 2005). Após o reconhecimento das DAMPs por TLR4, MyD88 (fator 88 de diferenciação mieloide) é recrutado e induz ativação de IKK- α e IKK- β , seguida por degradação de I κ B- α e ativação do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF- κ B) (Akira et al., 2001). O NF- κ B é transportado para o núcleo, iniciando a síntese e liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α , as quais atuam como mediadores da resposta inflamatória aguda (O'Neill, 2000). Esse fator também induz hiper-regulação da transcrição e tradução de moléculas como NLRP3 (Bauernfeind et al., 2009). Comparando gestantes normotensas e pré-eclâmpticas, Giorgi et al. (2012) demonstraram aumento da ativação de NF- κ B em células mononucleares do sangue periférico de gestantes portadoras de PE, associado à maior produção de TNF- α e IL-1 β . A maior produção dessas citocinas em gestantes com PE está em acordo com a literatura (Beckmann et al., 2004) e sugere que os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes de TNF- α podem estar associados às manifestações mais graves da PE (Peraçoli et al., 2007).

Após a hiper-regulação da transcrição e tradução de moléculas NLRP3, resultante da ativação do NF- κ B, um segundo estímulo é necessário para a ativação de NLRP3 (Bauernfeind et al., 2009). O segundo sinal está relacionado com a montagem e ativação do inflamassoma, onde diversas proteínas NLRP3 idênticas formam um oligômero, recrutando outras proteínas e ativando a proteína caspase-1, a qual cliva a pró-IL-1 β e pró-IL-18, resultando na geração de IL-1 β e IL-18 biologicamente ativas que, subsequentemente, são secretadas no meio extracelular (Dinarello, 1999; Pétrilli et al., 2007; Eder, 2009; Franchi et al., 2009; Abbas et al., 2012) (Figura 4). O inflamassoma pode ser ativado por vários estímulos (Martinon et al., 2009), dentre eles MSU e HA. Segundo Bauernfeind et al. (2009), a necessidade dessa dupla estimulação para ativar o inflamassoma pode ser importante para impedir a ativação descontrolada de NLRP3, responsável por consequências devastadoras no hospedeiro, como ocorre em doenças autoinflamatórias.

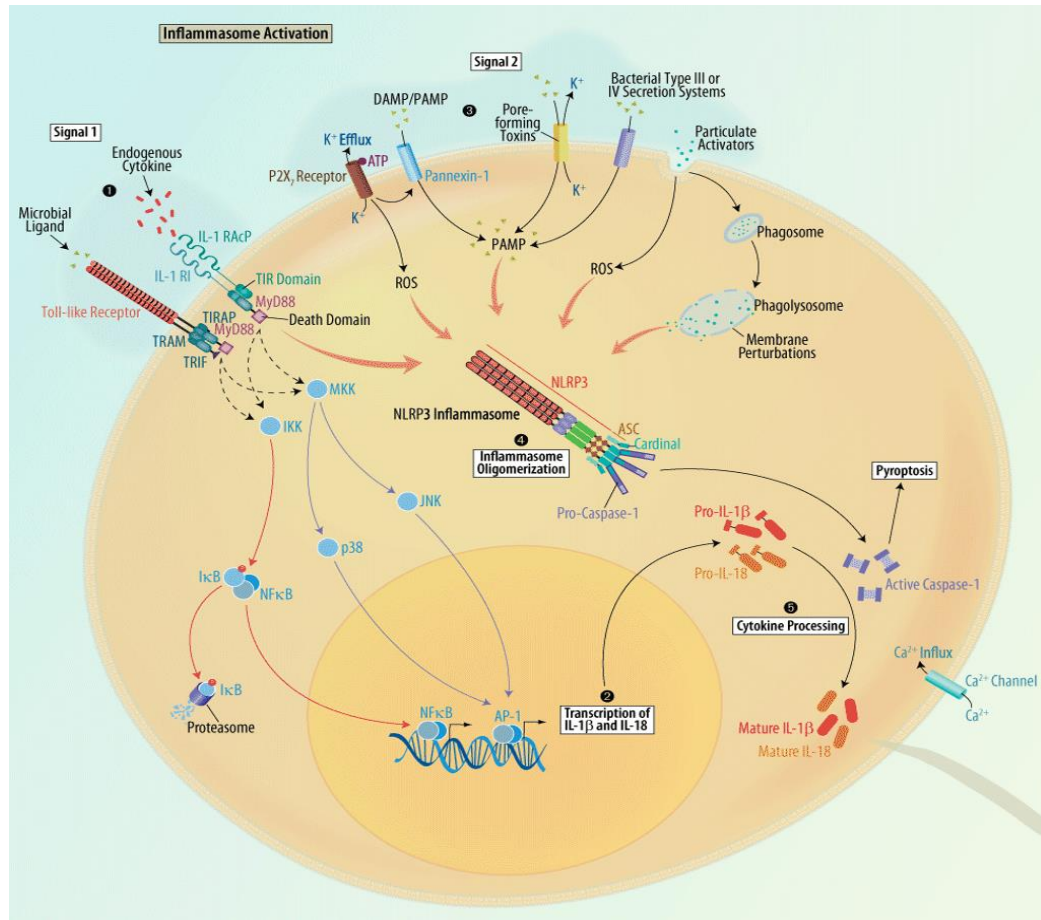


Figura 4. Cascata de ativação das vias do NF-κB e do inflamassoma por DAMPs (Figura adaptada de R&D Systems).

Em trabalho anterior demonstramos que, monócitos de gestantes portadoras de PE apresentam maior expressão gênica endógena dos receptores NLRP1 e NLRP3 e de caspase-1, bem como da produção de IL-1β e IL-18 em relação às gestantes normotensas, sugerindo a participação do inflamassoma NLRP3 na inflamação sistêmica que caracteriza a PE. O estímulo dessas células com MSU induziu maior expressão do inflamassoma NLRP3, mostrando que o ácido úrico é capaz de ativar esse complexo molecular e atuar na liberação de citocinas inflamatórias (Matias et al., 2015).

Além disso, estudos recentes de nosso laboratório demonstraram que, o estímulo de monócitos de gestantes portadoras de PE com hialurona induz maior expressão gênica de NLRP1, NLRP3 e caspase-1, bem como aumento na produção de IL-1β (Romão-Veiga et al., 2018).

Em conjunto, esses resultados demonstram que, a resposta inflamatória sistêmica exacerbada é uma característica chave na PE, representada por

concentrações excessivas de citocinas pró-inflamatórias, associadas à redução de citocinas imunossupressoras e fenótipo anormalmente ativado das células do sistema imune inato e adaptativo. Na PE, o desbalanço entre citocinas pró- e anti-inflamatórias e a ativação dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 parecem ser dependentes da deficiência de fatores reguladores capazes de modular essa resposta inflamatória como, por exemplo, a vitamina D e a progesterona. Esse desbalanço também poderia ser atenuado através da administração de produtos naturais com propriedades anti-inflamatórias como o flavonoide silibinina.

O entendimento da modulação das vias de ativação celular em monócitos humanos, por hormônios da gestação, vitamina D e agentes anti-inflamatórios poderá contribuir para a melhor compreensão do envolvimento da imunidade inata na fisiopatologia da PE e possivelmente propor formas alternativas para o tratamento dessa importante síndrome da gestação.

Referências

- Abbas AK, Lichtman A, Pillai S. Imunidade inata. In: *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 7^a.ed, 2012; p55-68.
- Abrahams VM. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *J Reprod Immunol*. 2011; 88(2):112-7.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors, critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001; 2(8):675-680.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. Clinical Management Guidelines for Obstetrician–Gynecologists. Acog practice bulletin number 202. Gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2019; 133(1): e1-e25.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002; 277(17):15028-34.
- Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 54(1):30-7.
- Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta*. 2008; 29:S67–S72.
- Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappa B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 2009; 183(2):787-91.
- Beckmann I, Efraim SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. *Hypertens Pregnancy*. 2004; 23(3):319-29.
- Berg S, Engman A, Holmgren S, Lundahl T, Laurent TC. Increased plasma hyaluronan in severe pre-eclampsia and eclampsia. *Scand J Clin Lab Invest*. 2001; 61:131-7.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11(5):309-16.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Nastasi G, Calatroni A. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80(4):480-90.
- Costa RAA, Peraçoli JP, Magalhães, CG, Bannwart-Castro CF, Martins AMVC, Peraçoli MTS. Association between renal dysfunction and angiogenic factors in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*. 2012; 3:252.
- Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, Peraçoli MT. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by

- monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res.* 2013; 47: 268-275.
- Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis.* 2003; 187 Suppl 2: S370-84.
- Dinarello CA. IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 3(1Pt1):11-24.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:519-50.
- Eder C. Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology.* 2009; 214(7):543-53.
- Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 2009; 10(3):241-7.
- Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1805(1):53-71.
- Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF-k β pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol.* 2012; 95(1-2):67-72.
- Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P, Sooranna SR, Steer PJ. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction? *Br J Obstet Gynaecol.* 2002; 109(7):836-9.
- Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, Nien JK, Gomez R, Mazor M, Saito S, Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193(3 Pt 2):921-7.
- Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2008; 15(3):231-42.
- Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, Núñez G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(2):220-5.
- Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A, Van der Post JA. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2009; 61(5):346-59.
- Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.* 2006; 118(2-3):268-75.
- Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:229-65.

- Marzi M; Viganò A; Trabattoni D; Villa ML; Salvaggio A, Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol.* 1996; 106(1):127-33.
- Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, Araújo JP Jr, Peraçoli JC, de Oliveira L, Peraçoli MT. Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in pregnant women with preeclampsia. *PLoS One.* 2015; 10(6):e0129095.
- Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstetter A, Agostini A, Capelle M, Mege JL, Bretelle F. Preeclampsia: impaired inflammatory response mediated by Toll-like receptors. *J Reprod Immunol.* 2008; 78(1):80-3.
- Mol BW, Roberts CT, Thangaratnam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2015; pii:S0140-6736:70-7.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:683-765.
- O'Neill LA. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28(5):557-563.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004; 279(9):7370-7.
- Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2013; 100(2):129-34.
- Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor- α in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2007; 57(3):177-85.
- Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor- α production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66(6):460-7.
- Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP-3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Different.* 2007; 14(9):1583-9.
- Pontillo A, Girardelli M, Agostinis C, Masat E, Bulla R, Crovella S. Bacterial LPS differently modulates inflammasome gene expression and IL-1 β secretion in trophoblast cells, decidual stromal cells, and decidual endothelial cells. *Reprod Sci.* 2013; 20(5):563-6.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180(2Pt1):499-506.

- Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005; 308(5728):1592-4.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta*. 2003; 24(suppl A):S21-S27.
- Redman, CW, Sargent, IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol*. 2004; 24:565-570.
- Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998; 16(1):5-15.
- Romao M, Weel IC, Lifshitz SJ, Peraçoli MT, Witkin SS. Elevated hyaluronan and extracellular matrix metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*. 2014; Mar;289(3):575-9.
- Romão-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Nunes PR, M Borges VT, Peraçoli JC, Peraçoli MTS. Induction of systemic inflammation by hyaluronan and hsp70 in women with pre-eclampsia. *Cytokine*. 2018; 105:23-31.
- Ruppert SM, Hawn TR, Arrigoni A, Wight TN, Bollyky PL. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. *Immunol Res*. 2014; 58(2-3):186-92.
- Saïd-Sadier N, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J*. 2012; 35(6):437-449.
- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol*. 2006; 177:1272-81.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*. 2006; 85:699-715.
- Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem*. 2004; 279:17079-84.
- Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens*. 2014; 4:97-104.
- Uzun H, Konukoglu D, Albayrak M, Benian A, Madazli R, Aydin S, Gelisgen R, Uludag S. Increased maternal serum and cord blood fibronectin concentrations in preeclampsia are associated with higher placental hyaluronic acid and hydroxyproline content. *Hypertens Pregnancy*. 2010; 29:153-62.
- Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Misaghi A, Hoffman HM, Gallo RL. NLRP3/Cryopyrin is necessary for interleukin-1 β (IL-1 β) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem*. 2009; 284(19): 12762–12771.

Yang CS, Shin DM, Jo EK. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *Int Neurorol J.* 2012; 16(1):2-12.

CAPÍTULO II

1 Article

2 Silibinin downregulates the NF- κ B pathway and 3 NLRP1/NLRP3 inflammasomes in monocytes from 4 pregnant women with preeclampsia

5 Mariana Leticia Matias^{1*}; Virginia Juliani Gomes²; Mariana Romao-Veiga¹; Vanessa Rocha
6 Ribeiro¹; Priscila Rezek Nunes¹; Mariane Font Fernandes²; Jose Carlos Peracoli¹; Maria
7 Terezinha Serrao Peracoli².

8 ¹Botucatu Medical School and ²Institute of Biosciences of Botucatu, Sao Paulo State University, UNESP;
9 Botucatu - Sao Paulo – Brazil

10 *Correspondence: mariana.l.matias@gmail.com; Tel.: +55-14-3880-0431

11 Received: date; Accepted: date; Published: date

12 **Abstract:** Preeclampsia (PE) is a human pregnancy-specific syndrome with abnormal activation
13 of cells from the innate immune system. The present study evaluated whether silibinin (SB)
14 treatment of monocytes from preeclamptic women could modulate NLRP1 and NLRP3
15 inflammasomes as well as TLR4/NF- κ B pathway activation. Peripheral blood monocytes from
16 20 preeclamptic and 20 normotensive (NT) pregnant women, as well as the THP-1 cell line,
17 were cultured with or without monosodium urate (MSU) or SB. NLRP1, NLRP3, Caspase-1, TLR4,
18 MyD88, NF- κ B, IL-1 β , IL-18, TNF- α and IL-10 gene expression was analysed with quantitative
19 real-time polymerase chain reaction (qPCR), while inflammatory cytokine production and
20 p65NF- κ B activity in monocytes was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assays
21 (ELISAs). Compared with NT women, monocytes from preeclamptic women showed higher
22 endogenous activation of NLRP1/NLRP3 inflammasomes and the TLR4/NF- κ B pathway as well
23 as higher gene and protein expression of IL-1 β , IL-18 and TNF- α , and lower expression of IL-
24 Monocyte stimulation with MSU increased inflammation-related genes as well as NF- κ B
25 activity. In vitro, SB treatment of monocytes from preeclamptic women reverted the basal
26 activation of these cells by decreasing NLRP1/NLRP3 inflammasomes and p65NF- κ B activity.
27 THP-1 cells exhibited a similar immunological response profile to monocytes from
28 preeclamptic women when cultured with or without MSU or SB. These results suggest uric
29 acid participates in the systemic inflammatory response characteristic of preeclampsia and
30 that in vitro SB treatment can modulate the sterile inflammation established in monocytes
31 from preeclamptic women.

32 **Keywords:** NLRP1/NLRP3 inflammasomes; NF- κ B; monocytes; monosodium urate; preeclampsia;
33 silibinin

34 1. Introduction

35 Silymarin is a flavonoid complex extracted from the seeds and fruit of *Silybum marianum*, a milk
36 thistle plant that belongs to the family Asteraceae. It is one of the oldest medicinal herbs, and it is
37 used as anti-inflammatory and hepatoprotective agent [1,2]. Silibinin (SB) is the main biologically
38 active component (70-80%) of silymarin and also presents anti-inflammatory, hepatoprotective, anti-
39 fibrotic, anticarcinogenic, antioxidant and immunomodulatory activities. Antioxidant and anti-
40 inflammatory SB properties were demonstrated by dose-dependent inhibition of hydrogen peroxide
41 (H₂O₂) release as well as production of tumour necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-10 (IL-10),

42 transforming growth factor beta (TGF- β) and prostaglandin E2 (PGE2) by peripheral blood
43 monocytes from healthy individuals stimulated with lipopolysaccharide (LPS) [3,4]. The SB anti-
44 inflammatory effects are attributed to its suppression of nuclear factor kappa-B (NF- κ B)-regulated
45 gene products [3,5,6]. Thus, NF- κ B plays a role in the pathogenesis of inflammation, a fact that
46 suggests that NF- κ B pathway inhibitors might be effective targets for treatment of chronic
47 inflammatory diseases [6].

48 Preeclampsia (PE) is a specific human syndrome of pregnancy with multisystem involvement;
49 it is considered the leading cause of maternal and foetal morbidity and mortality [7,8]. This pathology
50 is identified primarily by onset of clinical parameters such as hypertension and proteinuria from 20
51 weeks of gestation or by hypertension associated with maternal neurologic or hematologic
52 complications, kidney failure, liver involvement or foetal growth restriction [9-11]. Due to the
53 characteristic systemic inflammation in PE, there is excessive activation of inflammatory cells such as
54 monocytes and granulocytes and exacerbated production of pro-inflammatory cytokines [12,13] in
55 addition to reduced production of regulatory cytokines such as IL-10 and TGF- β [14]. Monocytes
56 from preeclamptic women are endogenously activated and therefore release significantly higher
57 TNF- α , superoxide anion (O_2^-) and H_2O_2 compared to monocytes from normotensive (NT) pregnant
58 women. These results suggest that PE is marked by oxidative stress and that the monocytes from
59 maternal peripheral blood might be an important source of free radicals and inflammatory cytokines,
60 all of which play a role in the pathogenesis of this disease [13,15].

61 Many preeclamptic women also show hyperuricemia associated with proteinuria and disease
62 severity, an observation that suggests uric acid may contribute to PE pathogenesis through its
63 inflammatory effects [15,16]. Uric acid induces inflammation and endothelial dysfunction [17], and
64 its crystals (monosodium urate – MSU) can activate the NLRP3 inflammasome, a multimeric protein
65 complex that is important for processing and releasing of IL-1 β and IL-18 [18,19]. This activation
66 requires two steps. The first, priming, is the interaction of a “danger signal”, such as pathogen-
67 associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs), with toll-
68 like receptors (TLRs), and subsequent NF- κ B pathway activation, which results in increased
69 transcription of NLRP3 and pro-IL-1 β as well as apoptosis-associated speck-like protein (ASC) [20].
70 In the second, or triggering step, DAMP molecules interact with nod-like receptors (NLRs), which
71 results in oligomerisation of NLRP3, ASC, and pro-Caspase-1. When activated, pro-Caspase-1
72 produces Caspase-1, and its activity leads to the biologically active IL-1 β and IL-18 that will be
73 secreted into the extracellular medium [21,22].

74 In previous studies, we demonstrated that SB inhibits NF- κ B pathway activation and pro-
75 inflammatory cytokine production, including IL-1 β and TNF- α , in peripheral blood mononuclear
76 cells (PBMCs) from pregnant women with preeclampsia [14,23]. Moreover, monocytes from
77 preeclamptic women showed endogenous activation of NLRP3 inflammasomes, and treatment of
78 these cells with MSU enhances activation of this inflammatory complex [24]. SB treatment of pregnant
79 rats in an experimental model of preeclampsia, induced by nitric oxide synthase inhibition with N-
80 omega-nitro-L-arginine methyl (L-NAME), improves reproductive outcome, normalises blood
81 pressure and platelet count and reduces proteinuria and serum levels of pro-inflammatory cytokines
82 [25].

82 Considering the SB anti-inflammatory properties, the present study investigated whether SB
83 exerts a modulatory effect on NLRP1 and NLRP3 inflammasomes and NF- κ B expression in
84 monocytes obtained from pregnant NT or preeclamptic women stimulated, *in vitro*, with
83 MSU and treated with SB. We also evaluated whether THP-1 cells, a human monocyte cell line,
84 have the same immunological response profile as these monocytes after treatment with MSU and SB.

85 2. Results

86 2.1. Clinical characteristics

87 Analysis of the clinical characteristics of preeclamptic and NT pregnant women (Table 1)
88 showed no statistical difference in maternal age or gestational age between the groups. Systolic and diastolic blood pressure, as well as proteinuria and uric acid concentration, were significantly higher in the preeclamptic compared to the NT group ($p < 0.05$).

89 **Table 1.** Clinical and laboratory characteristics of preeclamptic and NT pregnant women.

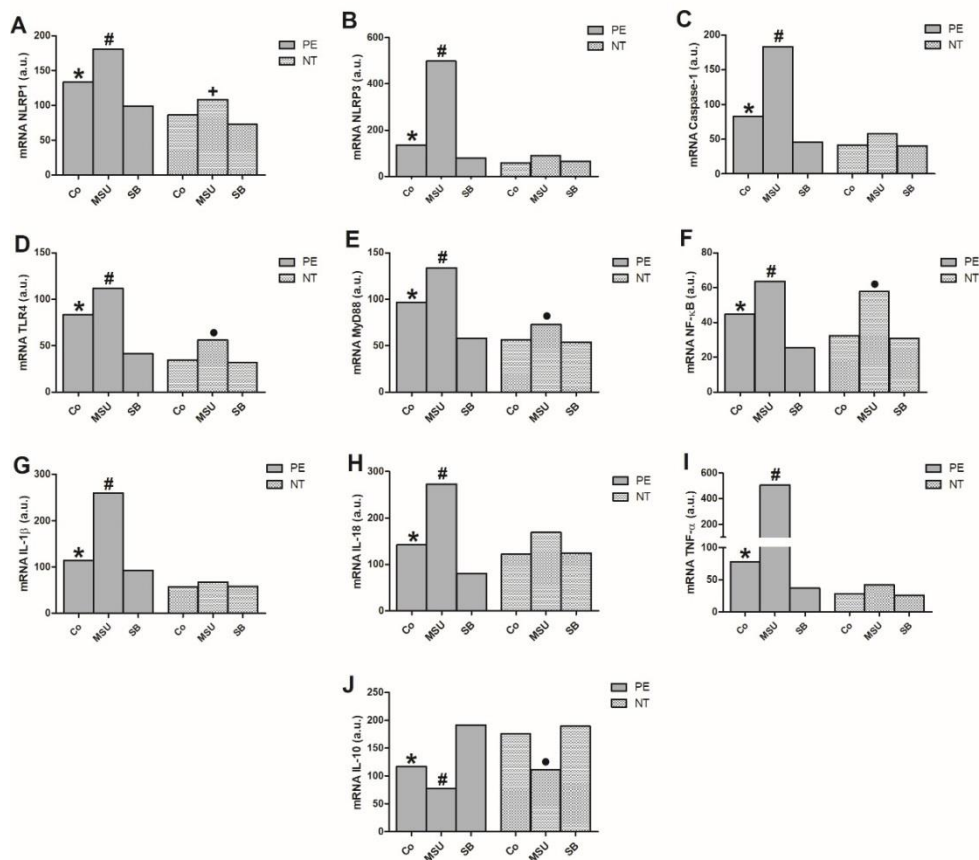
Characteristics	Pregnant women with preeclampsia (n = 20)	NT pregnant women (n = 20)
Age (years)	26 (17 – 41)	27 (18 – 40)
Gestational age (weeks)	34 (23 – 39)	35 (23 – 40)
Systolic Blood Pressure (mmHg)	160* (140 – 200)	110 (90 – 112)
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	110* (90 – 120)	69 (63 – 70)
Proteinuria (mg/24h)	7250* (300 – 18800)	< 300
Uric acid (mg/dL)	6.2* (3.9 – 10.1)	3.2 (2.3 – 4.7)

90 Data are presented as the median, with the minimum and maximum values in parentheses. * $p < 0.05$ vs. NT
91 pregnant women (Mann-Whitney U test).

92 2.2. Gene expression in monocytes cultured with MSU or SB

93 Basal *NLRP1*, *NLRP3*, *Caspase-1*, *TLR4*, *MyD88*, *NF- κ B*, *IL-1 β* , *IL-18* and *TNF- α* gene expression
94 (Figures 1A-1I) significantly increased in monocytes from women with PE compared to NT women.
95 Additionally, the endogenous gene expressions were higher than those exhibited by cultures of
96 monocytes treated with SB in the preeclamptic group. Stimulating cells with MSU significantly
97 enhanced activation of inflammasome-related genes (*NLRP1*, *NLRP3* and *Caspase-1*), *TLR4*, *MyD88*
98 and NF- κ B-pathway-related genes and inflammatory cytokine genes (*IL-1 β* , *IL-18* and *TNF- α*) when
99 compared to non-stimulated monocytes or those treated with SB in the preeclamptic group. There
100 was no significant difference in *NLRP3* and *Caspase-1* expression or the inflammatory cytokines in
101 monocytes from NT pregnant women stimulated with MSU or treated with SB. However, MSU
102 induced higher *NLRP1*, *TLR4*, *MyD88* and *NF- κ B* expression compared with control and SB-treated
103 cultures for this group (Figures 1A, 1D, 1E and 1F).

104 Endogenous *IL-10* expression (Figure 1J) by monocytes from pregnant preeclamptic women was
105 significantly lower compared to NT pregnant women monocytes as well as and to monocyte cultures
106 treated with SB from the PE group. After MSU stimulation, monocytes from preeclamptic women
107 exhibited lower *IL-10* expression compared to non-stimulated and SB-treated cultures. Thus, SB
108 treatment effectively increased *IL-10* expression in monocytes from preeclamptic women. In the NT
109 group, basal monocyte *IL-10* expression was significantly higher compared to that obtained after
110 MSU stimulation. *IL-10* expression was not affected in NT monocytes treated with SB.



116

117

118 **Figure 1.** Gene expression of NLRP1 (A), NLRP3 (B), Caspase-1 (C), TLR4 (D), MyD88 (E), NF-κB (F),

119 IL-1β (G), IL-18 (H), TNF-α (I) and IL-10 (J) in monocytes from 20 pregnant women with preeclampsia

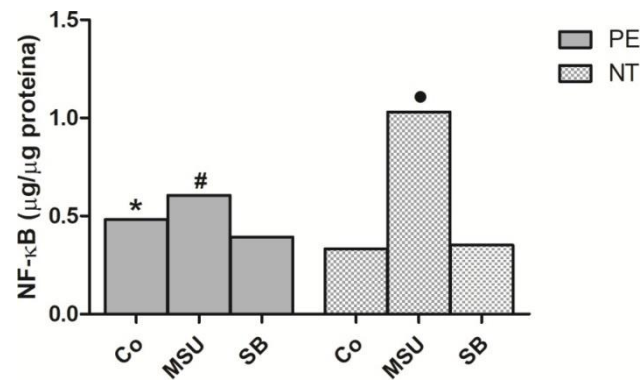
120 (PE) and 20 NT pregnant women, cultured in the absence (Co) or presence of MSU or SB. Results are

121 expressed as the median in arbitrary units (a.u.). * p < 0.05 vs. NT Co, PE SB; # p < 0.05 vs. PE Co, PE

122 SB; + p < 0.05 vs. NT SB; • p < 0.05 vs. NT Co, NT SB (Kruskal-Wallis test).

122 **2.3. Determination of NF-κB in monocyte nuclear extracts**

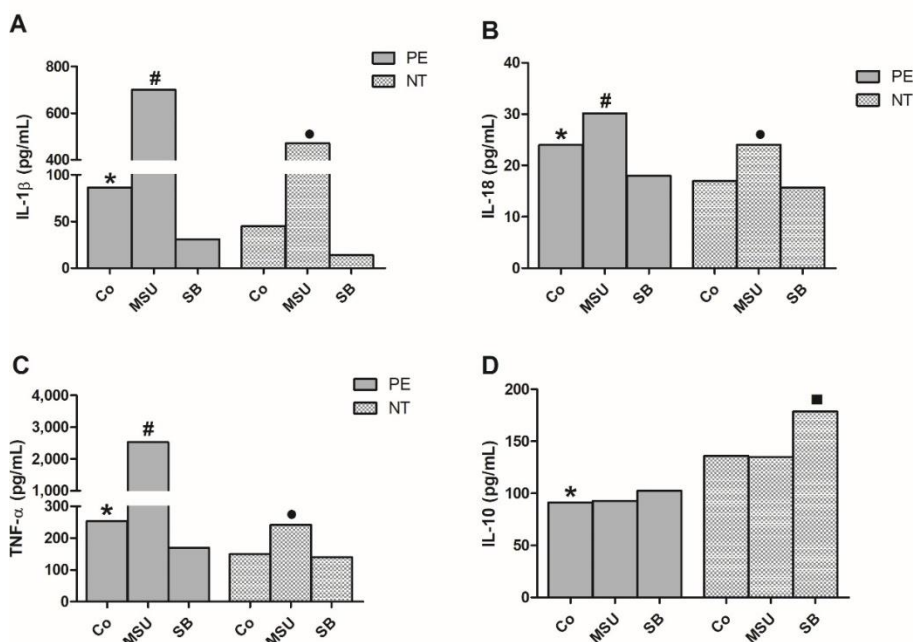
123 Monocytes from pregnant women with PE showed significantly higher basal activation of the
 124 nuclear transcription factor NF-κB compared with those from NT pregnant women (Figure 2). After
 125 monocyte stimulation with MSU, both preeclamptic and NT women showed a significant increase in
 126 the amounts of NF-κB compared to non-stimulated (Co) and SB-treated monocytes. Treatment with
 127 SB decreased NF-κB levels in monocytes from these groups.



128 **Figure 2.** NF-κB concentration in nuclear extracts of monocytes from 20 pregnant women with
 129 preeclampsia (PE) and 20 NT pregnant women, cultured in the absence (Co) or presence of MSU or
 130 SB. Results are expressed as the median. * $p < 0.05$ vs. NT Co, PE SB; # $p < 0.05$ vs. PE Co, PE SB; • $p <$
 131 0.05 vs NT Co, NT SB (Kruskal-Wallis test).

132 2.4. Cytokine production by monocytes from pregnant women

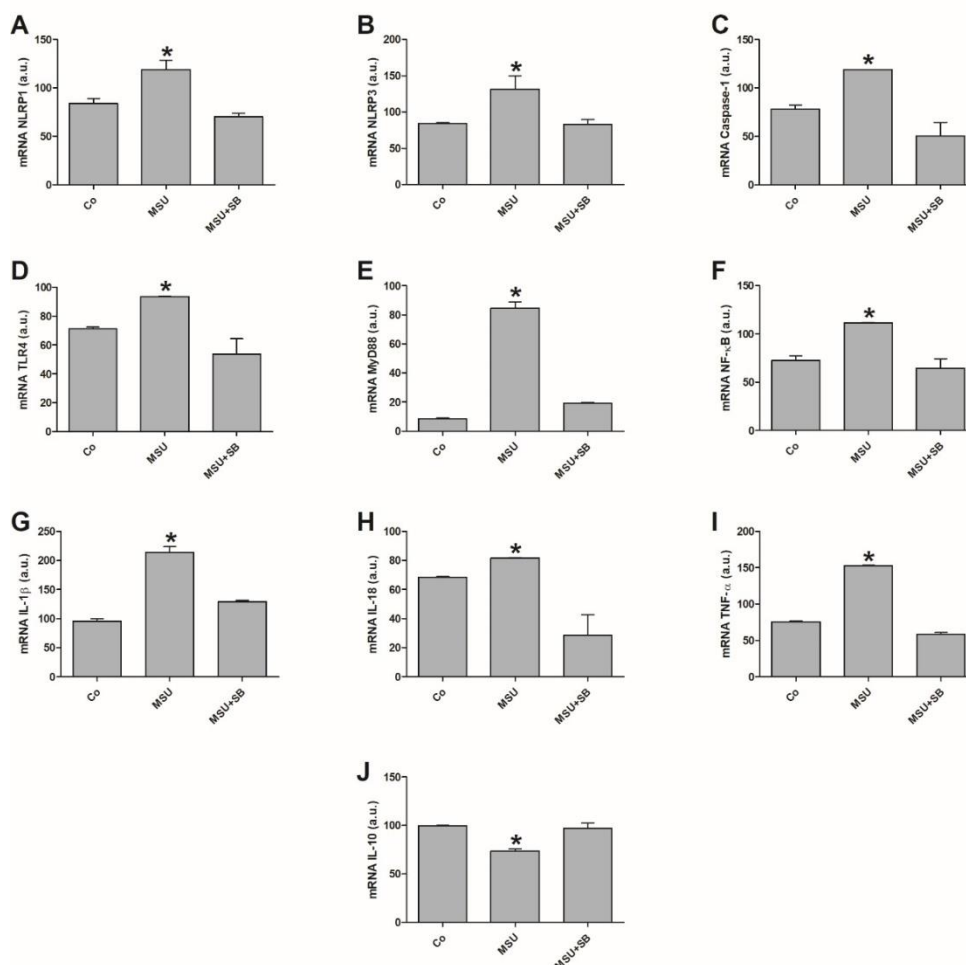
133 Figure 3 presents the production of TNF- α and IL-1 β by monocytes from preeclamptic and NT
 134 pregnant women, cultured in the absence or presence of MSU or SB. There was a significant increase
 135 in the endogenous IL-1 β , IL-18 and TNF- α concentrations produced by monocytes from pregnant
 136 preeclamptic compared to NT women. MSU stimulation induced higher IL-1 β , IL-18 and TNF- α
 137 production by cells from both groups when compared to their respective control (Co), and to
 138 monocytes treated with SB. SB treatment of monocytes from the preeclamptic group significantly
 139 decreased IL-1 β , IL-18 and TNF- α production when compared to the control culture.
 140 Basal IL-10 production in monocyte cultures from the PE group was significantly lower than in
 141 NT cultures. MSU treatment did not affect IL-10 production in the preeclamptic group, but it
 142 enhanced IL-10 in NT cultures.



143 3. IL-1 β (A), IL-18 (B), TNF- α (C) and IL-10 (D) production by monocytes. Monocytes from
 144 nt women with preeclampsia (PE) and NT pregnant women were cultured in the absence (Co)
 145 ence of MSU or SB. Results are shown as the median. *p < 0.05 vs. NT Co, PE SB; # p < 0.05 vs.
 146 PE SB; • p < 0.05 vs NT Co, NT SB; ■ p < 0.05 vs NT Co, NT MSU (Kruskal-Wallis test).

147 2.5. Gene expression in THP-1 cells cultured with MSU or SB

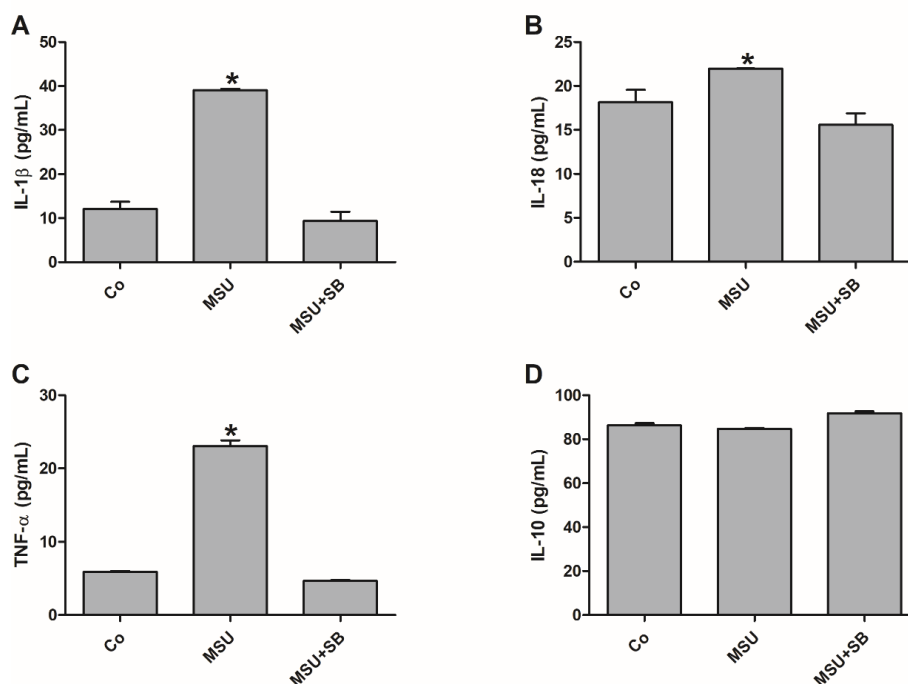
148 Relative quantification of NLRP1, NLRP3, Caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, IL-1 β , IL-
 149 18, TNF- α and IL-10 expression was performed in THP-1 cells that were either
 150 stimulated with MSU or stimulated with MSU and treated with SB. MSU-stimulated
 151 THP-1 cells had higher expression of inflammasome genes (NLRP1, NLRP3, Caspase-
 152 1, IL-1 β and IL-18) when compared to the control (Co) and MSU+SB-treated cultures
 153 (Figure 4A, 4B, 4C, 4G and 4H). Similar results were observed for TLR4, MyD88 and
 154 NF- κ B expression in these cells (Figure 4D-4F). TNF- α was significantly increased in
 155 MSU-stimulated THP-1 cells compared to the control and MSU+SB cultures (Figure 4I).
 156 Additionally, the anti-inflammatory cytokine IL-10 expression was significantly lower
 157 in THP-1 cells stimulated with MSU compared to the control culture and cultures
 158 treated with SB (Figure 4J).



166 **Figure 4.** Gene expression of NLRP1 (A), NLRP3 (B), Caspase-1 (C), TLR4 (D), MyD88 (E),
 167 NF-κB (F), IL-1β (G), IL-18 (H), TNF-α (I) and IL-10 (J) in THP-1 cells cultured in the absence (Co)
 168 or presence of MSU or SB. Results, obtained from five independent experiments, are shown as
 169 mean \pm standard deviation (SD) in arbitrary units (a.u.). * $p < 0.05$ vs. Co and MSU+SB (ANOVA).

170 2.6. Cytokine production by THP-1 cells cultured with MSU and/or SB

171 THP-1 cells stimulated with MSU produced increased concentrations of IL-1β and TNF-α when
 172 compared to the control and MSU+SB-treated cultures. IL-18 production by these cells after
 173 MSU stimulation was significantly higher than in MSU+SB cultures, but did not differ statistically
 174 from the control cultures. There were no significant differences between THP-1 cultures with
 175 regards to IL-10 production (Figure 5).



176 **Figure 5.** IL-1 β (A), IL-18 (B), TNF- α (C) and IL-10 (D) production by THP-1 cells cultured in the absence
 177 (Co) or presence of MSU or silibinin (SB). Results, obtained from five independent experiments, are
 178 shown as mean \pm SD in arbitrary units (a.u.). * $p < 0.05$ vs. Co, MSU+SB (ANOVA).

179 3. Discussion

180 The results of the present study show that monocytes from preeclamptic women are
 181 endogenously activated and may play a role in the systemic inflammatory response already
 182 described in PE [26,27]. Compared with NT pregnant women, basal gene expression of NLRP1 and
 183 NLRP3 inflammasomes, the TLR4/NF- κ B pathway and pro-inflammatory cytokines were
 184 significantly increased in monocytes from preeclamptic women, findings that highlight the
 185 inflammatory profile of these cells.

186 Activation of monocytes from preeclamptic patients includes high expression of surface markers
 187 such as TLR4 and CD64, increased production of pro-inflammatory cytokines and elevated oxygen
 188 free radical release compared with NT pregnant women [15,28,29]. The activation state of these cells
 189 seems to be related to DAMPs, circulating molecules capable of inducing inflammation [30]. Several
 190 DAMPs, such as uric acid [24], heat shock proteins (e.g., Hsp70) [31], products released from the
 191 extracellular matrix (e.g., hyaluronan) [32] and proteins released from damaged or stressed cells (e.g.,
 192 high mobility group box-1 (HMGB1)) [33], are elevated in preeclamptic patient plasma and may
 193 interact with TLRs or nod-like receptors with a pyrin domain (NLRP), actions that lead to monocyte
 194 activation in PE [27].

195 The results of significantly higher uric acid plasma concentrations in preeclamptic compared to
 196 NT pregnant women, detected in the present study, confirms previous reports [15,24]. The origin of
 197 this DAMP in plasma is unknown, but it is possible that hyperuricemia may induce inflammasomes
 198 and activate NF- κ B, changes that would result in an exaggerated inflammatory state in PE. Previous
 199 studies reported uric acid effects on the innate immune system, such as its potential to activate the
 200 inflammasome complex [18]. The present results demonstrated that monocyte stimulation with MSU

201 not only increased the gene expression of inflammasome components, but it also enhanced NF-κB
202 transcription and concentration in nuclear extracts. NF-κB pathway activation is essential to
203 upregulate pro-IL-1β and NLRP3 protein synthesis [34]. Furthermore, MSU stimulus increased *IL-1β*
204 and *TNF-α* mRNA levels, results that corroborate the literature [24]. On the other hand, the elevated
205 endogenous production of TNF-α by monocytes from preeclamptic women might act in
206 inflammasome complex activation by stimulating the NF-κB pathway and inducing *TNF-α* and *IL-1β*
207 transcription [35]. In turn, these cytokines may act by promoting NF-κB activation, which would
208 consequently maintain a cycle of cellular activation [36] that results in the excessive and chronic
209 inflammation observed in PE.

210 In the present study, diminished basal inflammatory gene expression for *NLRP1*, *NLRP3*, *Caspase-1*,
211 *TLR4*, *MyD88*, *NF-κB*, *IL-1β*, *IL-18* and *TNF-α* by monocytes from NT pregnant women could be
212 associated with IL-10 regulatory activity, namely once its gene and protein expression are
213 significantly higher than in monocytes from the PE group. Low IL-10 production by monocytes
214 occurs in patients with PE [14,29]. Thus, high IL-10 production plays beneficial roles in normal
215 pregnancy by promoting successful placentation and controlling excessive inflammation through
216 downregulation of *IL-1β* and *TNF-α* gene expression [37,38].

217 Our results demonstrated that in vitro treatment of monocytes from preeclamptic women with
218 SB induced *IL-10* expression, a finding which confirms the anti-inflammatory effect of this flavonoid
219 [3,6,23]. Moreover, in monocytes from the PE group, SB reverted the activation of inflammasome-
220 (*NLRP1*, *NLRP3* and *caspase-1*) and NF-κB-pathway-related (*TLR4*, *MyD88* and *NF-κB*) gene
221 expression and reduced NF-κB activation and its nuclear extract concentration. Regarding cytokine
222 gene expression, SB treatment reduced *IL-1β*, *IL-18* and *TNF-α* mRNA levels in monocytes from
223 preeclamptic women. These polyphenolic flavonoid effects might be related to a SB suppressive effect
224 on the phosphorylation of IκB, a protein bound to NF-κB in the cytoplasm that prevents its migration
225 to the nucleus and impairs the transcription of inflammation-related genes [39,40]. Thus, SB can
226 modulate inflammatory effects in these cells even when administrated in an already inflammatory
227 environment.

228 Activation of the NLRP1 and NLRP3 inflammasomes, the NF-κB pathway and inflammatory
229 cytokines by MSU, as well as their modulation by SB, were reproduced in the THP-1 human
230 monocyte cell line. We demonstrated that MSU activated THP-1 cells and, consequently, triggered
231 inflammasome and NF-κB pathway activation. On the other hand, SB-treated THP-1 cells showed a
232 marked reduction in their inflammatory profile, a change seen by diminished inflammation-related
233 gene expression and inflammatory cytokine production. These results confirm our previous findings
234 about the upregulation of inflammasomes by MSU in monocytes [24] and downregulation of NF-κB
235 activity and inflammatory cytokine production by SB treatment of PBMCs from pregnant women
236 with PE [23].

237 In conclusion, the present study suggests that uric acid participates in the excessive
238 inflammation present in PE by stimulating NLRP1/NLRP3 inflammasomes and the NF-κB pathway.
239 SB treatment modulated the sterile inflammation established in monocytes from pregnant women
240 with PE, an effect that demonstrate its relevant role on the regulation of the inflammatory response
241 in this disease. Considering these results, as well as the existing clinical uses and notorious safety of
242 this flavonoid, future studies on SB immunomodulatory effects on the exacerbated inflammation
243 characteristics of PE are encouraged to further elucidate its potential as an adjuvant treatment for this
244 gestational pathology.

245 4. Materials and Methods

246 4.1. Subjects

247 The study comprised 40 pregnant women without a previous history of hypertension
248 or obstetric and medical complications, admitted to the Obstetric Unit of Botucatu Medical
249 School, Botucatu, SP. Twenty women were diagnosed with PE, defined as a persistently

250 elevated blood pressure of 140 over 90 mmHg and proteinuria (≥ 300 mg in urine collected
251 during 24 h) after the twentieth week of gestation, or in the absence of proteinuria, by new-
252 onset hypertension associated with other complications such as thrombocytopenia, HELLP
253 (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count) syndrome, new-onset cerebral or visual
254 disturbances, renal insufficiency or acute pulmonary edema [9]. A group of 20 pregnant women
255 *with an uncomplicated pregnancy who remained NT and non-proteinuric were recruited as*
256 controls and matched for gestational age with the preeclamptic group. Gestational age was
257 calculated from the last menstrual period and confirmed by early (< 12 weeks gestation)
258 ultrasound examination. Proteinuria in 24-h urine was measured by a colorimetric method,
259 the Technicon RAXT automation system, and uric acid was assessed by uric acid enzymatic
260 Trinder (Biotrol Diagnostic) in the Clinical Laboratory of Botucatu Medical School – UNESP.
261 Exclusion criteria included prior preeclampsia, multiple gestation, illicit drug use and pre-
262 existing medical conditions such as diabetes, chronic hypertension and infectious and renal
263 disease. The Ethics Committee of the Botucatu Medical School approved the study (protocol
264 number 2.333.216), and all women gave written informed consent. Parents or guardians
265 signed for women aged less than 18 years.

266 4.2. Blood sampling

267 For the evaluation of gene expression, cytokine production and NF- κ B quantification in
268 monocytes from women with PE, blood was collected at the time of disease diagnosis, and from NT
269 pregnant women at the time when they were matched for gestational age with women with PE. Blood
270 samples (10 mL) were collected by venipuncture from the antecubital vein and were put into a
271 *sterile plastic tube that contained 10 U/ml ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Becton*
272 *Dickinson-BD Vacutainer; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).* After blood centrifugation at
273 4°C for 10 min at 1,200 g, the plasma fraction was removed and aliquots were stored at -80° until
274 *the time of cytokine determination.*

275 4.3. Monocyte cultures

276 After plasma separation, PBMCs were isolated by density gradient centrifugation on Ficoll-
277 Paque Premium [density (d) = 1.077] (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) as previously
278 described [15]. Cell viability, as determined by 0.2% trypan blue (Gibco) dye exclusion, was $> 95\%$ in
279 all experiments. Monocytes were counted using neutral red (0.02%) in the PBMC suspension, and 5
280 $\times 10^5$ monocytes/mL in complete medium were distributed (1 mL/well) in 24-well flat-bottomed
281 plates (NalgeNunc, Rochester, NY, USA). After incubation for 2 h at 37°C in a humidified $5\% \text{CO}_2$
282 atmosphere, non-adherent cells were removed by aspiration and each well rinsed twice with
283 complete medium. Monocyte preparations routinely contained $> 90\%$ monocytes as determined by
284 morphologic examination and staining for non-specific esterase [41]. Monocytes were incubated with
285 complete medium in the presence or absence of $50 \mu\text{g/mL}$ of MSU (Sigma-Aldrich) at 37°C in $5\% \text{CO}_2$
286 and/or $50 \mu\text{g/mL}$ of SB (Sigma-Aldrich) at 37°C in $5\% \text{CO}_2$. The MSU and SB concentrations used in
287 monocyte cultures were previously standardised by employing monocytes from five healthy non-
288 pregnant women.

289 4.4. THP-1 cell culture

290 THP-1 cells (ATCC No. TIB 202) were obtained from the collection of the Recombinant
291 Technology Laboratory (LATER; Bio-Manguinhos, Fiocruz) and maintained in liquid nitrogen ($-$
292 196°C) for a maximum of 12 months. Cells were thawed from cryotubes. Subsequently, they were
293 washed three times with 1x phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl (Merck KGaA, Darmstadt,
294 Germany), 2.7 mM KCl (Sigma-Aldrich), 10 mM Na_2HPO_4 (Merck) and 1.8 mM KH_2PO_4 (Merck)) pH

295 7.4. For maintenance, cells were cultured in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), formulated with 0.2% (v/v)
296 NaHCO₃ (Sigma-Aldrich) and supplemented with 20% (v/v) inactivated fetal bovine serum (Gibco),
297 and grown in 25 cm² T-bottles (Corning, Corning, USA) at 37°C in 5% CO₂ for 3 days. Cell
298 concentration and viability were determined on a haemocytometer by light microscopy (100x) using
299 a 1:50 dilution in 0.4% trypan blue.

300 For experimental preparations, cells were removed from the original culture medium, washed
301 twice in PBS and resuspended in 1 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal
302 bovine serum. After quantification, the cells were suspended at a concentration of 5 x 10⁵ cells/ml in
303 RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum.

304 4.5. Nuclear extraction of monocytes

305 Monocytes from preeclamptic and NT pregnant women, at a concentration of 5 x 10⁵ cells/ml,
306 were cultured for 30 min in the presence or absence of 50 µg/mL MSU or SB. The cells, obtained as
307 described in the monocyte cultures section, were subjected to nuclear extraction using a nuclear
308 extraction kit (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) according to the manufacturer's
309 instructions.

310 4.6. Determination of p65NF-κB activity

311 Nuclear extracts for each culture condition were employed to determine the p65NF-κB level by
312 using a transcription factor enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cayman Chemical)
313 according to the manufacturer's instructions. Total protein concentration in nuclear extracts was
314 determined by Lowry's method [42], and p65NF-κB was expressed as µg/µg of nuclear protein.

315 4.7. Cytokine determinations

316 Cytokine concentrations in monocytes and THP-1 culture supernatants were determined by
317 Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for TNF-α and IL-1β according to the
318 manufacturer's instructions. Assay sensitivity limits were 1.6 pg/mL for TNF-α, 1.0 pg/mL for IL-1β,
319 3.9 pg/mL for IL-10 and 2.25 pg/mL for IL-18.

320 4.8. Expression of transcripts related to inflammation

321 Monocytes and THP-1 cells were incubated with complete medium in the presence or absence
322 of 50 µg/mL MSU or SB for 4 h at 37°C in 5% CO₂. The cells were subjected to analysis of the
323 transcriptional level of the genes that encode the proteins NLRP1, NLRP3, Caspase-1, TLR4, MyD88,
324 NF-κB, IL-1β, IL-18, TNF-α and IL-10. Total RNA was extracted from monocytes with the Total RNA
325 Purification Kit (NorgenBiotek Corp., Thorold, Canada) according to the manufacturer's protocol.
326 After extraction, 1 µg of total RNA was incubated with DNase I Amp Grade (Invitrogen). The purity
327 and relative quality of samples were determined by fluorometry using Qubit® Fluorometric
328 Quantitation, Thermo Scientific. Subsequently, complementary DNA (cDNA) was synthesised in a
329 60µl reaction (with 450 ng total RNA) using the ImProm-II™ Reverse Transcription System,
330 according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)
331 was performed using RT GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) according to [24].
332 A 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) was used for analysis. Variants of the
333 studied targets were aligned in the MEGA 5.1 program and each primer was subsequently selected
334 by the software Primer-BLAST. Primers located in exon-exon junctions guarantee the purity of the
335 reaction, namely the absence of any genomic DNA that may contaminate it. The primer sequences
336 used in this study are shown in Table 2.

337 **Table 2.** Primers for inflammasome and NF-κB pathway components, cytokines and *GAPDH*.

338 Numbers indicate nucleotide positions in the corresponding transcripts.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	GenBank
<i>NLRP1</i>	(1728)TCCGGCTCCATTAGACAGA(1747)	(1810)AGACCCATCTGGCTCATCT(1791)	NM_033004.3
<i>NLRP3</i>	(2826)GAGGAAAAGGAAGGCCGACA(2845)	(2917)TGGCTGTTACCAATCCATGA(2897)	NM_004895.4
<i>CASP1</i>	(1065)AGACATCCCACAATGGGCTC(1084)	(1172)TGAAAATCGAACCTTGCGGAAA(1151)	NM_033292.3
<i>TLR4</i>	(2274)TGCTTCTTGCTGGCTGCATA(2293)	(2359)CCAGTCCTCATCTGGCTTG(2340)	NM_138554.4
<i>MYD88</i>	(263)GTCTCCTCCACATCCTCCT(282)	(344)TCCGCACGTTCAAGAACAGA(325)	NM_001172567.1
<i>NFKB1</i>	(1072) TGCAGCAGACCAAGGAGATG(1091)	(1211) TGCATTGGGGGCTTTACTGT(1192)	NM_003998.3
<i>IL1B</i>	(544)GAGCAACAAGTGGTGTCTCC(564)	(653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)	NM_000576.2
<i>IL18</i>	(438)ACTGTAGAGATAATGCACCCCG(459)	(517)AGTTACAGCCATACCTCTAGGC(496)	NM_001562.3
<i>TNF</i>	(325)GCTGCACCTTTGGAGTGATCG(344)	(462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)	NM_000594.3
<i>IL10</i>	(361)AAGACCCAGACATCAAGGCG(380)	(445)ATTCGATGACAGCGCCGTAG(426)	NM_000572.2
<i>GAPDH</i>	(684)CGTGGAAAGGACTCATGACCA(703)	(801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	NM_002046.4

339 4.9. Statistical Analysis

340 The clinical characteristics of pregnant NT or preeclamptic women, as well as the data on
341 monocyte gene expression, were analysed by non-parametric methods (Kruskal-Wallis and Mann-
342 Whitney U test). The data for THP-1 cellular gene expression and NF- κ B quantification were
343 evaluated by parametric analysis of variance (ANOVA). Results were evaluated using the statistical
344 program GraphPad Prism, version 6.01 (GraphPad, CA, USA), and statistical significance was
345 accepted at $p < 0.05$.

346 **Author contributions:** MLM, VJG, and MTSP conceived and designed the experiments, analysed data and wrote
347 the paper; JCP selected pregnant women for the study; MLM, VJG, MRV, VRR, PRN, MFF performed the
348 experiments. All authors read and approved the manuscript.

349 **Funding:** This project was supported by the Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo, Brazil,
347 FAPESP, (Grant numbers 2015/26147-3, 2016/18155-9 and 2016/22854-0).

348 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

349 References

- 350 1. Dixit, N.; Baboota, S.; Kohli, K.; Ahmad, S.; Ali, J. Silymarin: a review of pharmacological aspects and
351 bioavailability enhancement approaches. *Indian J. Pharmacol.* **2007**, *39*, 172-179.
- 352 2. Abenavoli, L.; Izzo, A.A.; Milić, N.; Cicala, C.; Santini, A.; Capasso, R. Milk thistle (*Silybum marianum*): a
353 concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *PhytotherRes.*
354 **2018**, *32*, 2202-2213.
- 355 3. Bannwart, C.F.; Nakaira-Takahagi, E.; Golim, M.A.; Medeiros, L.T.L.; Romão, M.; Weel, I.C.; Peraçoli, M.T.
356 Downregulation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway by silibinin in human monocytes challenged
357 with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Life Sciences.* **2010**, *86*, 880-886.
- 358 4. Bannwart, C.F.; Peraçoli, J.C.; Nakaira-Takahagi, E.; Peraçoli, M.T. Inhibitory effect of silibinin on tumour
359 necrosis factor- α and hydrogen peroxide production by human monocytes. *Nat Prod Res.* **2010**, *24*, 1747-
360 1757.
- 361 5. Manna, S.K.; Mukhopadhyay, A.; Van, N.T.; Aggarwal, B.B. Silymarin suppress TNF-induced activation of
362 NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol.* **1999**, *163*, 6800-6809.
- 363 6. Esmail, N.; Anaraki, S.B.; Gharagozloo, M.; Moayedi, B. Silymarin impacts on immune system as an
364 immunomodulator: One key for many locks. *Int Immunopharmacol.* **2017**, *50*, 194-201.
- 365 7. Sibai, B.; Dekker, G.; Kupferminc, M. Pre-eclampsia. *Lancet.* **2005**, *365*, 785-799.
- 366 8. Ghulmiyyah, L.; Sibai, B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin Perinatol.* **2012**, *36*, 56-59.
- 367 9. American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy.
368 Hypertension in pregnancy: report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force

369 on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* **2013**, *122*, 1122–1131.

370 10. Tranquilli, A.L.; Dekker, G.; Magee, L.; Roberts, J.; Sibai, B.M.; Steyn, W.; Zeeman, G.G.; Brown, M.A. The
371 classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement
372 from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* **2014**, *4*, 97-104.

373 11. Mol, B.W.; Roberts, C.T.; Thangaratnam, S.; Magee, L.A.; Groot, C.G.; Hofmeyr, G.J. Pre-eclampsia. *Lancet.*
374 **2016**, *387*, 999-1011.

375 12. Luppi, P., Deloia, J.A. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory
376 cytokines. *Clin Immunol.* **2006**, *118*, 268-275.

377 13. Peraçoli, J.C.; Rudge, M.V.C.; Peraçoli, M.T. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of
378 women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* **2007**, *57*, 177-185.

379 14. Cristofalo, R.; Bannwart-Castro, C.F.; Magalhães, C.G.; Borges, V.T.; Peraçoli, J.C.; Witkin, S.S.; Peraçoli,
380 M.T. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic
381 women. *Free Radic Res.* **2013**, *47*, 268-275.

382 15. Peraçoli, M.T.S.; Bannwart, C.F.; Cristofalo, R.; Borges, V.T.M.; Costa, R.A.A.; Witkin, S.S.; Peraçoli, J.C.
383 Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated
384 with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol.* **2011**, *66*, 460-467.

385 16. Livingston, J.R.; Payne, B.; Brown, M.; Roberts, J.M.; Côté, A.M.; Magee, L.A.; von Dadelszen, P.; PIERS
386 Study Group. Uric acid as a predictor of adverse maternal and perinatal outcomes in women hospitalized
387 with preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can.* **2014**, *36*, 870-877.

388 17. Zhao, J.; Zheng, D.Y.; Yang, J.M.; Wang, M.; Zhang, X.T.; Sun, L.; Yun, X.G. Maternal serum uric
389 acid concentration is associated with the expression of tumour necrosis factor- α and intercellular adhesion
390 molecule-1 in patients with preeclampsia. *J Hum Hypertens.* **2016**, *30*, 456-462.

391 18. Martinon, F.; Petrilli, V.; Mayor, A.; Tardivel, A.; Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the
392 NALP3 inflammasome. *Nature.* **2006**, *440*, 237-241.

393 19. Kingsbury, S.R.; Conaghan, P.G.; McDermott, M. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm*
394 *Res.* **2011**, *4*, 39-49.

395 20. Stutz, A.; Kolbe, C.C.; Stahl, R.; Horvath, G.L.; Franklin, B.S.; van Ray, O.; Brinkschulte, R.; Geyer, M.;
396 Meissner, F.; Latz, E. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain.
397 *J Exp Med.* **2017**, *214*, 1725-1736.

398 21. Schroder, K.; Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell.* **2010**, *140*, 821-832.

399 22. Jo, E.K.; Kim, J.K.; Shin, D.M.; Sasakawa, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome
400 activation. *Cell Mol Immunol.* **2016**, *13*, 148-159.

401 23. Giorgi, V.S.; Peraçoli, M.T.; Peraçoli, J.C.; Witkin, S.S.; Bannwart-Castro, C.F. Silibinin modulates the NF- κ B
402 pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women.
403 *J Reprod Immunol.* **2012**, *95*, 67-72.

404 24. Matias, M.L.; Romão, M.; Weel, I.C.; Ribeiro, V.R.; Nunes, P.R.; Borges, V.T.; Araújo, J.P. Jr.; Peraçoli, J.C.;
405 de Oliveira, L.; Peraçoli, M.T. Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in
406 pregnant women with preeclampsia. *PLoS One.* **2015**, *10*, e0129095.

407 25. Souza, C.O.; Peraçoli, M.T.; Weel, I.C.; Bannwart, C.F.; Romão, M.; Nakaira-Takahagi, E.; Medeiros, L.T.;
408 Silva, M.G.; Peraçoli, J.C. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of silibinin on experimental
409 preeclampsia induced by L-NAME in rats. *Life Sci.* **2012**, *91*, 159-165.

410 26. Borzychowski, A.M.; Sargent, I.L.; Redman, C.W. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal*
411 *Med.* **2006**, *11*, 309-316.

412 27. Romão-Veiga, M.; Matias, M.L.; Ribeiro, V.R.; Nunes, P.R.; Borges, V.T.M.; Peraçoli, J.C.; Peraçoli, M.T.S.
413 Induction of systemic inflammation by hyaluronan and hsp70 in women with pre-eclampsia. *Cytokine.*
414 **2018**, *105*, 23–31.

415 28. Chen, W.; Qian, L.; Wu, F.; Li, M.; Wang, H. Significance of toll-like receptor 4 signaling in peripheral blood
416 monocytes of pre-eclamptic patients. *Hypertens Pregnancy.* **2015**, *34*, 486-494.

417 29. Medeiros, L.T.; Peraçoli, J.C.; Bannwart-Castro, C.F.; Romão, M.; Weel, I.C.; Golim, M.A.; de Oliveira, L.G.;
418 Kurokawa, C.S.; Borges V.T.M.; Peraçoli, M.T. Monocytes from pregnant women with pre-eclampsia are
419 polarized to a M1 phenotype. *Am J Reprod Immunol.* **2014**, *72*, 5-13.

420 30. Khan, R.N.; Hay, D.P. A clear and present danger: inflammasomes DAMPING down disorders of
421 pregnancy. *Hum. Reprod. Update.* **2015**, *21*, 388-405.

422 31. Peraçoli, J.C.; Bannwart-Castro, C.F.; Romão, M.; Weel, I.C.; Ribeiro, V.R.; Borges, V.T.; Rudge, M.V.;
423 Witkin, S.S.; Peraçoli, M.T. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory
424 cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol.* **2013**, *100*, 129-134.

- 425 32. Romão, M.; Weel, I.C.; Lifshitz, S.J.; Peraçoli, M.T.; Witkin, S. Elevated hyaluronan and extracellular matrix
426 metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* **2014**, *289*, 575-579.
- 427 33. Naruse, K.; Sado, T.; Noguchi, T.; Tsunemi T.; Yoshida, S.; Akasaka, J.; Koike, N.; Oi, H.; Kobayashi, H.
428 Peripheral RAGE (receptor for advance glycation endproducts)-ligands in normal pregnancy and
429 preeclampsia: novel markers of inflammatory response, *J Reprod. Immunol.* **2012**, *93*, 69-74.
- 430 34. Afonina, I.S.; Zhong, Z.; Karin, M.; Beyaert, R. Limiting inflammation-the negative regulation of NF-κB and
431 the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol.* **2017**, *18*, 861-869.
- 432 35. Striz, I.; Brabcova, E.; Kolesar, L.; Liu, X.D.; Brabcova, I.; Sekerkova, A.; Poole, J.A.; Jaresova, M.; Slavcev,
433 A.; Rennard, S.I. Epithelial cells modulate genes associated with NF kappa B activation in co-cultured
434 human macrophages. *Immunobiology.* **2011**, *216*, 1110-1116.
- 435 36. Vallabhapurapu, S.; Karin, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the
436 immune system. *Annu Rev Immunol.* **2009**, *27*, 693-733.
- 437 37. Moore, K.W.; de Waal Malefyt, R.; Coffman, R.L.; O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-
438 10 receptor. *Annu Rev Immunol.* **2001**, *19*, 683-765.
- 439 **38.** Cubro, H.; Kashyap, S.; Nath, M.C.; Ackerman, A.W.; Garovic, V.D. The role of interleukin-10
440 in the pathophysiology of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* **2018**, *20*, 36.
- 441 39. Kim, B.R.; Seo, H.S.; Ku, J.M.; Kim, G.J.; Jeon, C.Y.; Park, J.H.; Jang, B.H.; Park, S.J.; Shin, Y.C.;
442 Ko, S.G. Silibinin inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of NF-
443 κB signaling pathway in HMC-1 human mast cells. *Inflamm. Res.* **2013**, *62*, 941-950.
- 444 40. Saurai, P. Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and
445 perspectives. *Antioxidants.* **2015**, *4*, 204-247.
- 446 41. Li, C.Y.; Lam, K.W.; Yam, L.T. Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem.* **1973**, *21*, 1-
447 12.
- 448 42. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol
449 reagent. *J Biol Chem.* **1951**, *93*, 265-275.

CAPÍTULO III

Efeito modulador da progesterona sobre as vias dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 e TLR4/MyD88/NF-kB em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e em células THP-1

Mariana Leticia Matias²; Mariana Romão-Veiga²; Vanessa Rocha Ribeiro²; Priscila Rezeck Nunes²; Virgínia Juliani Gomes²; Amanda Carreira Devides²; José Carlos Peraçoli²; Maria Terezinha Serrão Peraçoli¹.

¹Instituto de Biociências de Botucatu e ²Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP; Botucatu - Sao Paulo – Brasil

Resumo

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez, associada com inflamação sistêmica exacerbada, que poderia ser dependente da deficiência de fatores reguladores, como a progesterona (PG), capaz de modular essa resposta inflamatória. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, o efeito modulador da PG sobre os inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e sobre a via de sinalização dependente de TLR4-MyD88 em monócitos de gestantes portadoras de PE e em linhagem celular de monócitos humanos THP-1. Monócitos obtidos do sangue periférico de 20 gestantes com PE, 20 gestantes normotensas e células THP-1 foram cultivados na presença ou ausência de urato monossódico (MSU), hialurona (HA) e PG por diferentes períodos: a) por 30 min para determinação da fosforilação de NF- κ B e para expressão dos fatores intra-citoplasmáticos NF- κ B e I κ B α por citometria de fluxo, b) por 4h para avaliar a expressão gênica de TLR4, MYD88, NFKB1, NLRP1, NLRP3, CASP1, IL1B, IL18, TNF e IL10 analisada por RT-qPCR e c) por 18h para a determinação da concentração das citocinas IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-10 por ELISA e da expressão do receptor de superfície TLR4 por citometria de fluxo. Foram determinados os níveis plasmáticos de ácido úrico e PG em gestantes pré-eclâmpicas e normotensas. Os resultados foram analisados por meio de testes paramétricos e não-paramétricos com nível de significância de 5%. Os níveis plasmáticos de PG foram significativamente menores, enquanto os de ácido úrico foram maiores em gestantes com PE quando comparados com gestantes normotensas. Monócitos de gestantes com PE apresentaram maior ativação endógena dos genes inflamatórios (TLR4, MYD88, NFKB1, NLRP1, NLRP3, CASP1, IL1B, IL18 e TNF) e menor de IL10 em comparação com as gestantes normotensas. A expressão de TLR4 e NF- κ B foi maior, enquanto a de I κ B α foi menor no grupo de gestantes com PE quando comparada à de gestantes normotensas. A maior atividade basal de NF- κ B fosforilado, observada em monócitos de gestantes com PE, apresentou-se menor após o tratamento dessas células com PG. O estímulo com MSU e HA aumentou a expressão dos genes e proteínas relacionados à inflamação e diminuiu a de IL-10 em monócitos de gestantes com PE, enquanto o tratamento com PG teve efeito imunomodulador, diminuindo essa expressão. No grupo PE, os estímulos com MSU e HA aumentaram a expressão de NF- κ B e diminuíram a de I κ B α . Por outro lado, o tratamento dos monócitos com PG induziu diminuição de TLR4 e NF- κ B e aumento de I κ B α . Células

THP-1 apresentaram perfil de resposta imunológica semelhante à dos monócitos de gestantes pré-eclâmpicas, após estímulo com MSU e HA e tratamento com PG. Os resultados sugerem a participação de MSU e de HA na resposta inflamatória sistêmica da PE e, que o tratamento das gestantes com PG poderia diminuir essa inflamação, devido ao papel imunomodulador desse hormônio sobre a ativação de monócitos na PE.

Palavras-chave: monócitos, pré-eclâmpsia, urato monossódico, hialurona, NF-kB, inflamassomas NLRP1/NLRP3, progesterona.

Abstract

Preeclampsia (PE) is a pregnancy-specific syndrome, associated with a huge systemic inflammation, which may be dependent on the deficiency of regulatory factors, such as progesterone (PG), which is capable of modulating the inflammatory response. The aim of the present study was to evaluate, *in vitro*, the modulatory effect of PG on NLRP1/NLRP3 inflammasomes and on the TLR4/MyD88-dependent signaling pathway in monocytes from pregnant women with PE and in human monocyte cell line THP-1. Monocytes obtained from the peripheral blood of 20 preeclamptic and 20 normotensive (NT) pregnant women, as well as the THP-1 cells, were cultured with or without monosodium urate (MSU), hyaluronan (HA) and PG for different periods: a) for 30 min to determine the expression of NF- κ B phosphorylated and for expression of NF- κ B and I κ B α intracytoplasmic factors by flow cytometry, b) for 4 h to evaluate the gene expression of TLR4, MYD88, NFKB1, NLRP1, NLRP3, CASP1, IL1B, IL18, TNF and IL10 analyzed by qPCR and c) for 18 h to determine the concentration of IL-1 β , IL-18, TNF- α and IL-10 cytokines by ELISA, and the expression of TLR4 surface receptor by flow cytometry. Plasma levels of uric acid and PG were determined in preeclamptic and NT pregnant women. The results were analyzed using parametric and non-parametric tests with a significance level of 5%. Plasma levels of PG were significantly lower, whereas uric acid levels were higher in pregnant women with PE when compared to NT pregnant women. Monocytes from preeclamptic women showed higher endogenous activation of the inflammatory genes (TLR4, MYD88, NFKB1, NLRP1, NLRP3, CASP1, IL1B, IL18 and TNF) and lower of IL10 compared to NT pregnant women. The expression of TLR4 and NF- κ B was higher, whereas I κ B α was lower in PE than in NT group. The higher basal activity of phosphorylated NF- κ B, observed in monocytes from pregnant women with PE, was lower after PG treatment. MSU and HA stimuli increased the expression of genes and proteins related to inflammation and decreased the IL-10 in monocytes from pregnant women with PE, whereas the cell treatment with PG led to immunomodulatory effect, diminishing this expression. In PE group, MSU and HA stimuli increased NF- κ B and decreased I κ B α expression. On the other hand, treatment of monocytes with PG induced a decrease of TLR4 and NF- κ B and increase of I κ B α . THP-1 cells presented a similar immune response profile to the monocytes from preeclamptic women after MSU and HA stimuli and PG treatment. The results suggest the involvement of MSU and HA in the systemic

inflammatory response of PE and that the treatment of preeclamptic women with PG may be able of reducing this inflammation due to the immunomodulatory role of this hormone on the monocyte activation in PE.

Keywords: monocytes, preeclampsia, monosodium urate, hyaluronan, NF- κ B, NLRP1/NLRP3 inflammasomes, progesterone.

1. Introdução

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez associada à hipertensão de início recente, a partir da 20ª. semana de gestação, em mulheres previamente normotensas. Apesar de muitas vezes acompanhado de proteinúria, o aparecimento de hipertensão arterial e outros sinais ou sintomas de PE podem ocorrer em algumas mulheres na ausência de proteinúria (Homer et al., 2008). Assim, devem ser diagnosticadas como portadoras de PE, mulheres que apresentem qualquer uma das seguintes manifestações clínicas graves: valor de pressão arterial sistólica maior ou igual a 160 mmHg ou pressão arterial diastólica maior ou igual a 110 mmHg, insuficiência renal, comprometimento hepático, alterações neurológicas ou hematológicas, edema pulmonar na ausência de proteinúria. (Tranquilli et al., 2014; ACOG, 2019). Essas características graves aumentam o risco de morbidade e mortalidade materna, fetal e neonatal (Von Dadelszen et al., 2011).

A PE caracteriza-se por resposta inflamatória sistêmica exagerada, decorrente da ativação endógena de células da imunidade inata e adaptativa, que se reflete na ativação excessiva de leucócitos do sangue periférico e que pode interferir na progressão da gravidez normal (Lok et al., 2009; Ribeiro et al., 2017). Este distúrbio imunológico parece ter sua origem na placenta, resultante de lesão tecidual causada por isquemia/hipóxia e decorrente da falha de invasão das artérias uterinas pelo trofoblasto fetal (Huppertz, 2008). A diminuição da oferta local de oxigênio e nutrientes está associada à morte celular aumentada do trofoblasto (Wu et al., 2012), que pode resultar na liberação de mediadores de ativação endotelial e inflamação sistêmica materna (Redman & Sargent, 2003). Esses mediadores, liberados após necrose do trofoblasto (Huppertz et al., 2003) incluem DNA fetal, ácido úrico, *High Mobility Group Box 1* (HMGB1), produtos de matriz extracelular, IL-1 α entre outros, caem na circulação materna e podem interagir com leucócitos circulantes, contribuindo para a resposta inflamatória intensa descrita na PE. Assim, a resposta inflamatória sistêmica exacerbada, que na PE geralmente ocorre na ausência de infecção microbiana, tem sido descrita como inflamação estéril (Nadeau-Vallée et al., 2016; Brien et al., 2018).

Os fatores endógenos desencadeantes dessa inflamação estéril são conhecidos como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) ou alarminas e que contribuem tanto para a inflamação placentária local como para a inflamação sistêmica e a disfunção endotelial (Khan & Hay, 2015). DAMPs como cristais de ácido

úrico (Matias et al., 2015), reativos intermediários do oxigênio, proteínas de choque térmico (HSPs) (Asea et al., 2002; Mandrekar et al., 2008), proteínas liberadas de células lesadas como HMGB1 (Park et al., 2004) e produtos liberados da matriz extracelular, como fibronectina e hialurona (Okamura et al., 2001; Campo et al., 2010; SaïdSadier & Ojcius, 2012) exercem seu efeito inflamatório por meio da interação com receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos em células da imunidade inata. Os principais são os receptores semelhantes ao Toll (TLRs) que reconhecem e ligam moléculas presentes tanto na superfície de patógenos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Koga & Mor, 2008), como DAMPs (Matzinger, 2002; Kim et al., 2005). Outros PRRs são membros da família de receptores Nod-like ou NLR (proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica), que são proteínas citosólicas que reconhecem PAMPs e DAMPs dentro do citoplasma da célula do hospedeiro e recrutam outras proteínas, formando complexos de sinalização que promovem a inflamação e são denominados inflamassomas, gerando formas ativas de IL-1 β (Franchi et al., 2009). Segundo Khan & Hay (2015), as DAMPs podem induzir hiperativação dos inflamassomas, resultando na manutenção do estado inflamatório intenso, observado na PE.

Na literatura há relatos de ativação endógena de receptores TLR4 e de inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em monócitos de gestantes portadoras de PE e de sua contribuição para a produção de citocinas inflamatórias e patogênese da PE (Al-Ofi et al., 2014; Medeiros et al., 2014; Chen et al., 2015; Matias et al., 2015). Esses estudos confirmam o envolvimento de monócitos na intensa resposta inflamatória intravascular descrita na PE (Redman & Sargent, 2003; Borzychowski et al., 2006). Em trabalho recente demonstramos que o estímulo, *in vitro*, de monócitos de gestantes pré-eclâmpticas com DAMPs como cristais de ácido úrico e hialurona induzem ativação de inflamassomas, representada por expressão gênica aumentada de NLRP1, NLRP3 e seus componentes caspase-1, IL-1 β e IL-18, além de maior síntese de IL-1 β e TNF- α . Por outro lado, o cultivo das células com Hsp70 não induziu ativação de inflamassoma, mas levou à produção de maiores concentrações de IL-1 β e TNF- α , sugerindo que Hsp70 induz ativação de monócitos por mecanismo independente da ativação de inflamassomas (Romão-Veiga et al., 2018). Assim, níveis significativamente elevados de ácido úrico, hialurona, Hsp70, HMGB1 e citocinas inflamatórias foram descritos no plasma de gestantes portadoras de PE

quando comparadas às gestantes normotensas (Berg et al., 2001; Peraçoli et al., 2011; Naruse et al., 2012; Peraçoli et al., 2013; Raghupathy et al., 2013; Romão et al., 2014; Romão-Veiga et al., 2018) e contribuem para o desenvolvimento e manutenção da resposta inflamatória sistêmica nessas gestantes (Zhu et al., 2015).

Em conjunto esses resultados demonstram que na PE, ao contrário da gestação normal, ocorre um desvio para um perfil inflamatório, que poderia ser decorrente da falha de mecanismos moduladores, capazes de regular a inflamação.

Já é bem conhecido, que hormônios da gestação como estrógeno e progesterona são produzidos pela placenta e exercem importante papel no estabelecimento e manutenção da gestação (Shin et al., 2018). Tanto estrógeno quanto progesterona são produzidos pelo trofoblasto placentário a partir de 6 a 8 semanas de gestação (Tulchinsky et al., 1972) e seu aumento durante a gestação capacitam o útero e a placenta a melhorar a vascularização, transferir nutrientes e suportar o desenvolvimento fetal (Pepe & Albrecht, 1999), além de regular a adaptação cardiovascular pelo aumento do fluxo sanguíneo durante a gravidez (Chung & Leinwand, 2014). A progesterona é também importante na supressão da resposta imunológica materna aos antígenos fetais, prevenindo assim, a rejeição do trofoblasto e facilitando sua implantação no organismo materno (Walter et al., 2005). Na gestação humana, a produção de progesterona é produzida inicialmente pelo corpo lúteo, mas após 8 semanas de gestação aumenta gradualmente sendo produzida principalmente pela placenta (Arck et al., 2007). A progesterona interage com vários receptores celulares, tais como nucleares (PR), de membrana (mPR) e receptores para glicocorticóides (GR) presentes em células mononucleares do sangue periférico, sendo seu principal efeito sobre células da resposta imune, mediado por interação com receptores GR (Li et al., 2006; Dosiou et al., 2008; Engler et al., 2017; Ugor et al., 2018).

Embora a suplementação de progesterona, na forma de caproato de 17-alfa-hidroxiprogesterona seja empregada rotineiramente na prevenção de parto prematuro recorrente (Meis, 2006; Merlob et al., 2012; Romero et al., 2014), estudos em gestantes portadoras de PE são escassos e necessários para se determinar a segurança de seu emprego nessa doença. Há relatos de que a progesterona pode controlar a pressão sanguínea em mulheres com PE (Sammour et al., 1982) e reduzir significativamente a incidência das manifestações da doença quando ministrada

precocemente durante o primeiro trimestre da gestação (Schindler, 2010; Zainul Rashid et al., 2014).

Vários estudos mostram que os níveis plasmáticos de progesterona estão significativamente diminuídos em mulheres portadoras de PE em comparação a gestantes normotensas (Kiprono et al., 2013; Shin et al., 2018; Wan et al., 2018; Zhang et al., 2018), sugerindo que essa deficiência possa estar envolvida na patogênese da PE. Embora haja relatos das propriedades imunorreguladoras da progesterona sobre a resposta imune na gestação (Shah et al., 2018), não se conhecem seus efeitos sobre a PE.

O efeito modulador da progesterona foi descrito em modelo experimental de PE em ratas, induzido por isquemia placentária e em culturas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) cultivadas com plasma de gestantes pré-eclâmpticas ou de gestantes normotensas. O tratamento dos animais com progesterona atenuou a hipertensão arterial e a secreção de endotelina-1 induzidas por isquemia placentária, enquanto os níveis plasmáticos significativamente menores de progesterona, detectados nas gestantes portadoras de PE estimularam a produção de endotelina-1 pelas células HUVEC. A suplementação de progesterona na cultura tratada com plasma de gestantes pré-eclâmpticas diminuiu a secreção de endotelina pelas células endoteliais, demonstrando papel protetor desse hormônio sobre ativação e disfunção endotelial na PE (Kiprono et al., 2013). Outros estudos *in vitro* e experimentais ainda mostram importante papel da progesterona na diminuição da resposta inflamatória induzida por citocinas inflamatórias, que leva a alterações patológicas observadas na PE (Keiser et al., 2009; Amaral et al., 2014; 2015).

Considerando que a intensa resposta inflamatória sistêmica detectada na PE está associada à produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação do complexo inflamassoma em monócitos do sangue periférico, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, em modelo *in vitro*, o efeito modulador anti-inflamatório da progesterona sobre a expressão dos inflamassomas NLRP1, NLRP3 e sobre a via TLR4/MyD88/NF-κB em monócitos do sangue periférico de gestantes portadoras de PE e em linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

2. Material e Métodos

2.1. Casuística

Foram estudadas 20 primigestas portadoras de PE e 20 primigestas normotensas que realizaram a assistência ao parto na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. A idade gestacional dos grupos estudados foi estabelecida pela data da última menstruação e confirmada por exame ultra-sonográfico precoce (< 20 semanas de gestação).

Uma gestante foi considerada portadora de PE quando, sem antecedente de hipertensão arterial, manifestou hipertensão arterial ($\geq 140 \times 90$ mmHg) associada à proteinúria (≥ 300 mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20ª semana de gestação (ACOG, 2019).

O tamanho amostral foi calculado, considerando-se a diferença de médias entre IL-1 β para gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, com base nos resultados apresentados em trabalho anterior (Matias et al., 2015). Considerando uma confiabilidade de 95%, poder de 90% e 20% de variabilidade nos valores de IL-1 β , o tamanho amostral foi de, no mínimo 20 indivíduos no grupo.

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo CAAE nº 56533616.4.0000.5411).

2.2. Critérios de inclusão

- Gestantes com PE: gestação única, com idade gestacional entre 28 e 40 semanas, diagnóstico de PE e sem qualquer outra intercorrência clínica ou obstétrica.
- Gestantes normotensas: gestação única, com idade gestacional entre 28 e 40 semanas e sem qualquer intercorrência clínica ou obstétrica.

2.3. Dosagem de 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.

2.4. Colheita de sangue

A colheita de sangue para determinação de ácido úrico e progesterona e para a avaliação da expressão de moléculas relacionadas aos inflamassomas, fator de transcrição NF- κ B, receptor TLR4 e produção de citocinas por monócitos de gestantes portadoras de PE foi feita no momento do diagnóstico da doença e, a de gestantes normotensas, no momento em que foram pareadas pela idade gestacional com as gestantes pré-eclâmpicas. Amostras de sangue (10 mL) foram coletadas por punção venosa da veia antecubital e foram colocadas em tubo plástico estéril contendo 10 U/mL de EDTA (Becton Dickinson-BD Vacutainer; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Após centrifugação por 10 min a 3000 g, o plasma obtido foi removido e alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento de sua utilização.

2.5. Dosagem de ácido úrico e progesterona no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia e de gestantes normotensas

O ácido úrico foi determinado no plasma de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas por método enzimático, no sistema de automação Trinder (Biotrol Diagnostic) do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Os níveis plasmáticos de progesterona (PG) foram determinados pelo método de quimiluminescência automatizada por micropartículas (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*, CMIA) com *Architect Progesterone Reagent Kit*, pelo analisador Architect® i2000 (Abbott®, Santa Clara, California, USA). A sensibilidade analítica é de 0,1 ng/mL, segundo descrição do kit. Os valores mínimos e máximos esperados para gestantes no terceiro trimestre (após 24 semanas de gestação) são, respectivamente, 17,9 e 242,5 ng/mL.

2.6. Isolamento e cultura de monócitos

O sangue periférico obtido das gestantes foi colocado em tubo estéril contendo EDTA (Greiner Bio-one, Americana - Brasil). As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), segundo a técnica descrita por Peraçoli et al. (2011). O anel rico

em células mononucleares foi lavado com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 10 min a 200 g. Após esses procedimentos, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI para posterior contagem, utilizando-se o corante Turk 5% (1:1). Após contagem, a concentração celular foi ajustada para 1×10^7 PBMCs/mL. Para a separação de monócitos, foi utilizado o kit de Beads magnéticas por seleção negativa Pan Monocyte Isolation Kit, Human (Miltenyi Biotec, Germany) segundo orientações do fabricante, em colunas MS (Miltenyi Biotec).

Após separação, os monócitos obtidos foram contados com solução de Turk 5% (1:1) e a concentração foi acertada conforme a quantidade de células necessária para cada método empregado.

2.7. Cultura de linhagem celular de monócitos humanos THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC nº. TIB 202) foi obtida do acervo do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos, Fiocruz mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) por no máximo 12 meses. As células foram descongeladas de criotubos. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS [137mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 2.7mM KCl (Sigma-Aldrich), 10mM Na_2HPO_4 (Merck) e 1.8mM KH_2PO_4 (Merck)] 1X pH 7.4. Para a manutenção celular foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), formulado com 0,2% (v/v) de NaHCO_3 (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% (v/v) de soro bovino fetal inativado (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e mantidas em garrafas T de 25 cm^2 (Corning, Corning, NY - USA) a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 por 3 dias. A concentração e viabilidade celular foram determinadas em hemocitômetro por microscopia óptica (100x) utilizando-se a diluição de 1:50 em azul de tripan 0,4% (Gibco/Thermo Fisher Scientific). No preparo das células para a realização dos experimentos, as células foram removidas do meio de cultura original, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal. Após a quantificação, as células foram ressuspensas na concentração de 5×10^5 células/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal.

2.8. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de monócitos e de células THP-1

Para avaliar a produção de IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-10, monócitos de gestantes (5×10^5 monócitos/mL) e as células THP-1 (5×10^5 células/mL), obtidos conforme descrito nos itens 2.6 e 2.7, respectivamente, foram incubados a 37°C, em tensão de 5% de CO₂ por 18 h, na presença ou ausência de 50 μ g/mL de MSU (Sigma-Aldrich) ou 100 μ g/mL de HA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ou 1×10^{-5} mol/L de PG (Sigma-Aldrich). As concentrações de MSU e de HA foram previamente padronizadas em culturas de monócitos de mulheres saudáveis, não-grávidas e empregadas conforme descrito em trabalhos anteriores do grupo (Matias et al., 2015; Romão-Veiga et al., 2018). O sobrenadante obtido após 18 h de cultivo foi aspirado, centrifugado a 600 g e distribuído em alíquotas, que foram conservadas a -80°C até o momento da dosagem das citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA).

2.9. Determinação de p65NF- κ B fosforilado

Para avaliar o efeito da progesterona (PG) sobre a ativação de p65NF- κ B fosforilado, monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e de normotensas (5×10^5 células/ml) foram cultivados por 30 minutos na presença ou ausência de PG (1×10^{-5} mol/L). Os monócitos foram então submetidos à extração nuclear utilizando-se *Cell Lysis Buffer 1x* (Cell Signaling Technology, Danvers, MA – USA) com a adição de PMSF (1 mM) por 5 min. Após esse período, o extrato foi centrifugado à 14000 g por 10 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado à -80°C. A concentração total de proteína nos extratos foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Para avaliar a ativação de NF- κ B, foi empregado o PathScan Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) Sandwich ELISA kit (Cell Signaling Technology), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de p65NF- κ B encontrada foi dividida pela quantidade de proteína total presente nessas células e os resultados expressos em μ g de p65-NF- κ B/ μ g de proteína.

2.10. Avaliação da expressão de transcritos relacionados à inflamação

Os monócitos de gestantes (5×10^5 monócitos/mL) e as células THP-1 (5×10^5 células/mL) foram cultivados na presença ou ausência de MSU, HA, e PG por 4 h nas concentrações já citadas no item 2.8 e, posteriormente submetidos à análise da expressão, em nível transcricional, dos genes que codificam as proteínas NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-10. O RNA total dos monócitos e das células THP-1 foram extraídos por meio do sistema Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Canada), conforme protocolo do fabricante. Após a extração, a fim de garantir a completa remoção de DNA genômico, 1 μ g de RNA total foi incubado com DNase I Amp Grade (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). A pureza e qualidade relativa de todas as amostras de RNA total obtidas foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente, a síntese de DNA complementar (cDNA) para execução da Reação em Cadeia da Polimerase acoplada a transcrição reversa (*Reverse Transcription-coupled Polymerase Chain Reaction – RT-PCR*) foi realizada com 450 ng de RNA total por 60 μ l de reação, utilizando ImProm-II™ Reverse Transcription System, conforme protocolo do fabricante.

A quantificação da expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-10 foi efetuada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com Matias et al. (2015). O aparelho utilizado foi 7500 Fast Real-time PCR Systems (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

As diversas variantes dos alvos estudados foram alinhadas no programa MEGA 5.05 e, posteriormente, cada iniciador foi escolhido por meio do programa Primer-BLAST. Para cada alvo, foram selecionados iniciadores localizados na junção éxon-éxon. Iniciadores presentes em tal junção garantem a pureza da reação, ou seja, a ausência de qualquer DNA genômico que possa contaminá-la. As sequências dos iniciadores utilizadas no presente estudo estão detalhadas no Quadro 1.

Quadro 1. Sequências dos iniciadores para a análise da expressão dos genes NLRP1, NLRP3, CASP1, TLR4, MYD88, NFKB1, IL1B, IL18, TNF e IL10 em estudo por qPCR.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	GenBank
NLRP1	(1728)TCCGGCTCCCATTAGACAGA(1747)	(1810)AGACCCATCCTGGCTCATCT(1791)	NM_033004.3
NLRP3	(2826)GAGGAAAAGGAAGGCCGACA(2845)	(2917)TGGCTGTTACCAATCCATGA(2897)	NM_004895.4
CASP1	(1065)AGACATCCCACAATGGGCTC(1084)	(1172)TGAAAATCGAACCTTGCGGAAA(1151)	NM_033292.3
TLR4	(2274)TGCTTCTTGCTGGCTGCATA(2293)	(2359)CCAGTCCTCATCCTGGCTTG(2340)	NM_138554.4
MYD88	(263)GTCTCCTCCACATCCTCCCT(282)	(344)TCCGCACGTTCAAGAACAGA(325)	NM_001172567.1
NFKB1	(1072) TGCAGCAGACCAAGGAGATG(1091)	(1211) TGCATTGGGGGCTTTACTGT (1192)	NM_003998.3
IL1B	(544)GAGCAACAAGTGGTGTCTCC(564)	(653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)	NM_000576.2
IL18	(438)ACTGTAGAGATAATGCACCCCG(459)	(517)AGTTACAGCCATACCTCTAGGC(496)	NM_001562.3
TNF	(325)GCTGCACTTTGGAGTGATCG(344)	(462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)	NM_000594.3
IL10	(361)AAGACCCAGACATCAAGGCG(380)	(445)ATTCGATGACAGCGCCGTAG(426)	NM_000572.2
GAPDH	(684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703)	(801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	NM_002046.4

2.11. Análise da expressão de TLR4, NF- κ B e I κ B α por meio da técnica de citometria de fluxo

Monócitos de gestantes portadoras de PE, de normotensas e de células THP-1 foram cultivados na presença ou ausência de MSU, HA e PG por 30 minutos, nas mesmas concentrações já citadas no item 2.8, para análise da expressão dos fatores intra-citoplasmáticos NF- κ B e I κ B α e, por 18 horas para a análise do receptor de superfície TLR4. A concentração celular foi ajustada para 2×10^5 células/mL e as células distribuídas em tubos Falcon para citômetro (BD Bioscience). As células foram incubadas com anticorpos BD Biosciences, com os respectivos fluorocromos: anti-CD14 (Alexa FLuor 488) e anti-TLR4 (PE) por 30 min, no escuro. Após centrifugação, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de ázida sódica e 1% de soro bovino fetal e centrifugadas novamente por 10 min a 400g. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando Fix Buffer (BD) e Perm Buffer (BD) para incubação com anticorpos marcados com fluorocromos específicos contra as proteínas intracelulares NF- κ B (PE-Cy7) e I κ B α (Alexa FLuor 647), por 30 min, no escuro e em temperatura ambiente. Para cada teste, tubos controles foram incubados com anticorpos isotípicos específicos para cada fluorocromo (Alexa FLuor 488, PE, PE-Cy7 e Alexa Fluor 647). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo modelo FACSCanto™ (BD) usando programa “FlowJo” (FlowJo Enterprises, Ashland, OR,

USA) para adquirir e analisar multiparâmetros celulares. Foi padronizada a aquisição de 30.000 eventos por amostra, sendo otimizada a população de interesse, estabelecendo-se *gate* (janela) com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL) de CD14. A partir desse *gate*, estabelecido nos monócitos positivos para CD14, a média de intensidade de fluorescência (MIF) de TLR4, NF-κB e IκBα foi avaliada.

2.12. Determinação de citocinas pela técnica de ELISA

Para quantificação das citocinas IL-1β, IL-18, TNF-α e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de monócitos e cultura de células THP-1, foi empregado ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se kits comerciais específicos (R&D Systems).

Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonais e policlonais, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas-padrão, foram recomendadas pelo fabricante. O limite de sensibilidade dos kits foi de 1,0 pg/ml para IL-1β, 5,15 pg/ml para IL-18, 4,0 pg/ml para TNF-α e 3,9 pg/ml para IL-10.

2.13. Análise estatística

Os resultados foram avaliados empregando-se testes paramétricos ou não-paramétricos, segundo o programa estatístico PRISM, (Graph Prism, versão 6.01, GraphPad, CA, EUA). A avaliação das características clínicas e dosagens plasmáticas das gestantes portadoras de PE e de normotensas foram realizadas pelo teste de U de Mann-Whitney. A comparação dos resultados de expressão gênica e proteica de monócitos submetidos a diferentes tratamentos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn. A análise dos resultados obtidos das células THP-1 foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

A análise das características clínicas e laboratoriais das gestantes portadoras de PE e das normotensas mostrou não haver diferença estatística entre os grupos avaliados, com relação aos parâmetros de idade e idade gestacional (Tabela 1). No entanto, os valores da pressão arterial sistólica e diastólica, bem como os níveis de proteinúria e ácido úrico foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no grupo de gestantes com PE do que em gestantes normotensas. Por outro lado, a concentração plasmática de progesterona, mostrou-se significativamente menor no grupo de gestantes portadoras de PE em comparação com as normotensas.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e de gestantes normotensas.

Características	Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (n = 20)	Gestantes normotensas (n = 20)
Idade (anos)	26 (14 – 43)	25 (18 – 38)
Idade gestacional (semanas)	35 (24 – 40)	34 (23 – 39)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	160* (140 – 200)	105 (95 – 110)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	110* (90 – 120)	65 (60 – 70)
Proteinúria (mg/urina 24h)	3105* (300 – 19800)	< 300
Ácido úrico (mg/dL)	6.2* (3.9 – 10.1)	3.2 (2.3 – 4.7)
Progesterona (ng/mL)	94.5* (21.3 – 165.6)	128.8 (97.7 – 244.0)

Os valores estão expressos em mediana, com os valores mínimo e máximo entre parênteses. * ($p < 0,05$) vs gestantes normotensas (teste *U* de Mann-Whitney).

3.2. Expressão gênica de monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas

Realizou-se a quantificação relativa da expressão dos genes para NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-18 e IL-10 em monócitos de 20 gestantes portadoras de PE e 20 gestantes normotensas, estimulados ou não com MSU ou HA e tratados ou não com PG.

A expressão gênica basal de NLRP1, NLRP3, Caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, IL-1 β , IL-18 e TNF- α (Figura 1A-I) foi significativamente maior em monócitos de

gestantes com PE quando comparados com o grupo de normotensas. O tratamento com MSU e HA aumentou a expressão de todos os genes estudados, exceto IL-10, em monócitos de PE em comparação com às culturas Co e tratadas com PG. O cultivo de monócitos com PG, por sua vez, diminuiu a expressão desses genes no grupo PE (Figura 1A-I). Não houve diferença significativa na expressão dos genes relacionados aos inflamassomas e citocinas inflamatórias em monócitos de gestantes normotensas estimulados com as DAMPs ou tratados com PG. Contudo, o estímulo com MSU e HA induziu maior expressão gênica de TLR4, MyD88 e NF- κ B no grupo de normotensas (Figura 1D-F).

Quanto à expressão do gene que codifica a citocina anti-inflamatória IL-10, monócitos de gestantes pré-eclâmpticas apresentaram menor expressão endógena quando comparada com a de gestantes normotensas (Figura 1J). O cultivo de monócitos de gestantes com PE na presença de MSU ou HA diminuiu a expressão do gene da IL-10, enquanto o tratamento dessas células com PG levou ao seu aumento. Monócitos do grupo de normotensas, quando cultivados com MSU, mostraram menor expressão gênica de IL-10 em comparação à cultura controle (Co). O tratamento com HA e com PG não alterou a expressão de IL-10 nesse grupo de gestantes (Figura 1J).

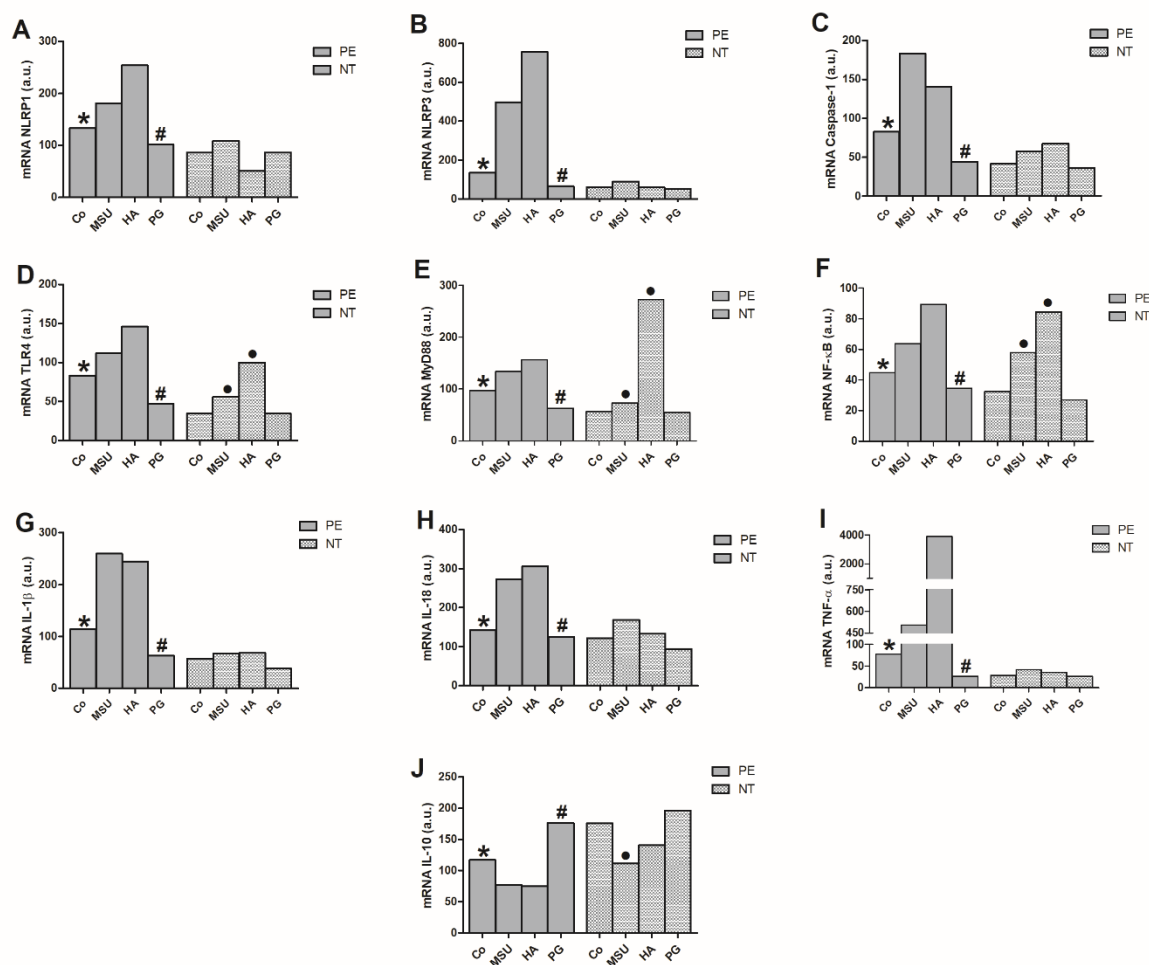


Figura 3. Expressão gênica de NLRP1 (A), NLRP3 (B), Caspase-1 (C), TLR4 (D), MyD88 (E), NF-κB (F), IL-1β (G), IL-18 (H), TNF-α (I) e IL-10 (J) em monócitos de 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e 20 gestantes normotensas (NT), cultivados na presença ou ausência de urato monossódico (MSU), hialurona (HA) ou progesterona (PG). Resultados foram expressos em mediana de unidades arbitrárias (a.u.). * $p < 0.05$ vs. PE MSU, PE HA, PE PG e NT Co; # $p < 0.05$ vs. PE MSU e PE HA; • $p < 0.05$ vs. NT Co e NT PG (Teste de Kruskal-Wallis).

3.3. Determinação de citocinas em sobrenadante de cultura de monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas

A produção das citocinas IL-1β, IL-18, TNF-α e IL-10 por monócitos de 20 gestantes portadoras de PE e 20 gestantes normotensas, estimulados ou não com MSU ou HA e tratados com PG está representada na Figura 2.

Observou-se concentração basal de IL-1β, IL-18 e TNF-α produzida por monócitos de gestantes portadoras de PE significativamente mais elevada em relação ao grupo de normotensas (Figura 2A-C), enquanto a concentração de IL-10 foi menor (Figura 2D).

Os níveis proteicos de IL-1 β e IL-18 apresentaram aumento devido à adição de MSU e HA na cultura de monócitos de gestantes portadoras de PE. Já o tratamento com PG diminuiu esses níveis. Monócitos de gestantes normotensas produziram maior quantidade de IL-1 β quando estimulados com MSU e HA (Figura 2A).

O estímulo com MSU acentuou os níveis proteicos de TNF- α em relação à produção endógena (Co) no grupo PE. No entanto, a adição de HA à cultura não foi capaz de causar aumento significativo (Figura 2C). O tratamento com PG, por sua vez, diminuiu a produção de TNF- α nas pacientes com PE (Figuras 2C). Em relação ao grupo de normotensas, monócitos dessas gestantes produziram maiores níveis de TNF- α quando estimulados com MSU e HA (Figura 2C).

É possível observar que a produção de IL-10 não apresentou alteração com a adição de MSU, HA ou PG nas culturas de monócitos de gestantes com PE e de gestantes normotensas (Figura 2D).

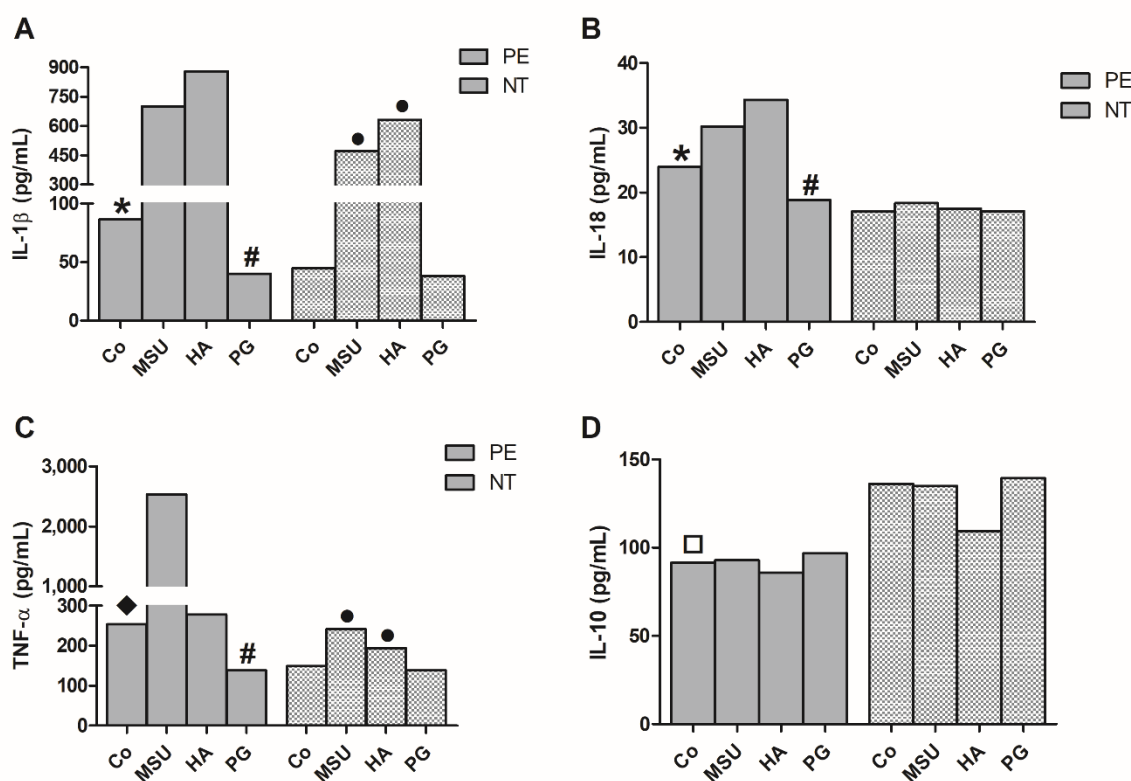


Figura 4. Produção IL-1 β (A), IL-18 (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) por monócitos de 20 gestantes com pré-eclâmpsia (PE) e de 20 gestantes normotensas (NT), cultivados na presença ou ausência de urato monossódico (MSU), hialurona (HA) ou progesterona (PG). Resultados foram expressos em mediana. * $p < 0.05$ vs. PE MSU, PE HA, PE PG e NT Co; # $p < 0.05$ vs. PE MSU e PE HA; • $p < 0.05$ vs. NT Co e NT PG; ♦ $p < 0.05$ vs. PE MSU, PE PG e NT Co; □ $p < 0.05$ vs. NT Co (Teste de Kruskal-Wallis).

3.4. Análise da expressão do receptor TLR4 e dos fatores intracitoplasmáticos NF- κ B e I κ B α em monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas

A análise por citometria de fluxo mostrou que monócitos de gestantes portadoras de PE apresentaram maior expressão endógena de TLR4 e NF- κ B e menor expressão de I κ B α quando comparada ao grupo de gestantes normotensas (Figura 3A-C).

O cultivo de monócitos de gestantes pré-eclâmpticas com MSU e HA não aumentou a expressão de TLR4 pelas células. No entanto, o tratamento com PG diminuiu seu nível (Figura 3A). Em relação ao grupo das gestantes normotensas, monócitos cultivados na presença de MSU e HA apresentaram maior expressão de TLR4 em relação às culturas controle (Co) e tratadas com PG (Figura 3A).

O nível proteico de NF- κ B apresentou aumento devido à adição de MSU e HA na cultura de monócitos de gestantes portadoras de PE, enquanto o tratamento com PG diminuiu esses níveis (Figura 3B).

Monócitos de gestantes com PE cultivados na presença de MSU e HA apresentaram diminuição da expressão de I κ B α , enquanto o tratamento com PG causou aumento desse fator. Monócitos de gestantes normotensas também expressaram menores quantidades de I κ B α quando estimulados com MSU e HA (Figura 3C).

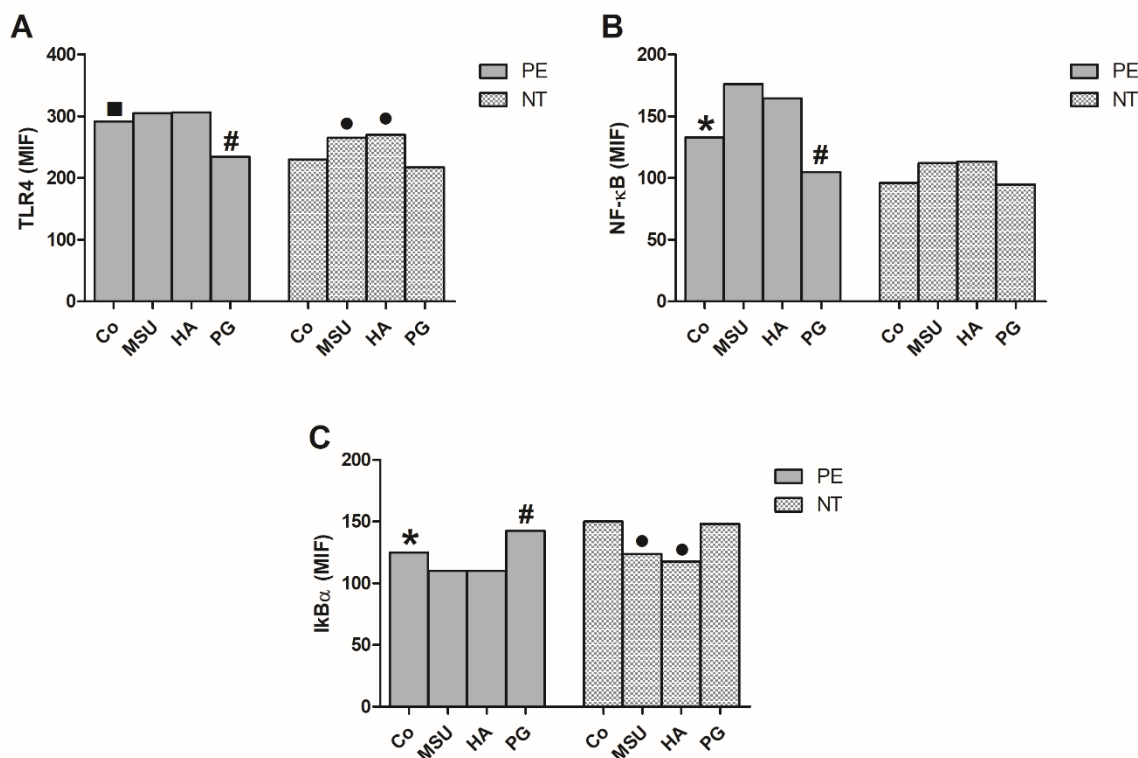


Figura 5. Expressão do receptor de superfície TLR4 e dos fatores intra-citoplasmáticos NF-κB e IκBα em monócitos de 20 gestantes com pré-eclâmpsia (PE) e de 20 gestantes normotensas (NT), cultivados na presença ou ausência de urato monossódico (MSU), hialurona (HA) ou progesterona (PG). Resultados foram expressos em mediana. * $p < 0.05$ vs. PE MSU, PE HA, PE PG e NT Co; # $p < 0.05$ vs. PE MSU e PE HA; • $p < 0.05$ vs. NT Co e NT PG; ■ $p < 0.05$ vs. PE PG e NT Co (Teste de Kruskal-Wallis).

3.5. Determinação de NF-κB fosforilado em monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas

Monócitos de gestantes portadoras de PE e de normotensas, tratados ou não com PG, foram avaliados quanto ao nível proteico de NF-κB fosforilado.

Observa-se maior concentração endógena de NF-κB fosforilado em monócitos de gestantes portadoras de PE do que em gestantes normotensas. Além disso, monócitos de gestantes pré-eclâpticas apresentaram menores níveis de NF-κB fosforilado após tratamento com PG. Não houve diferença significativa entre os tratamentos dos monócitos no grupo das gestantes normotensas (Figura 4).

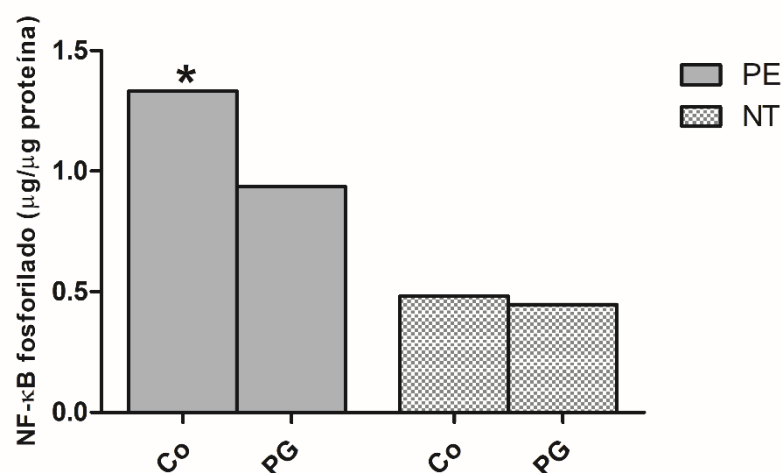


Figura 6. Atividade do NF-κB fosforilado em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e de gestantes normotensas (NT). Monócitos das gestantes foram cultivados na ausência (Co) ou na presença de progesterona (PG). Os resultados foram expressos em mediana. * $p < 0.05$ vs. PE PG e NT Co.

3.6. Expressão gênica de células THP-1

Realizou-se a quantificação relativa da expressão dos genes para NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, MyD88, NF-κB, TNF-α, IL-1β, IL-18 e IL-10 em células THP-1 estimuladas ou não com MSU e HA e tratadas com PG.

O cultivo de THP-1 na presença de MSU e HA aumentou a expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, MyD88, NF-κB, IL-1β, IL-18 e TNF-α, e diminuiu a expressão de IL-10 quando comparado com as culturas Co e MSU+PG/HA+PG (Figuras 5 e 6). A adição de PG às culturas estimuladas com MSU e HA diminuiu a expressão dos genes inflamatórios e aumentou a expressão de IL-10 (Figura 5J) e HA (Figura 6J).

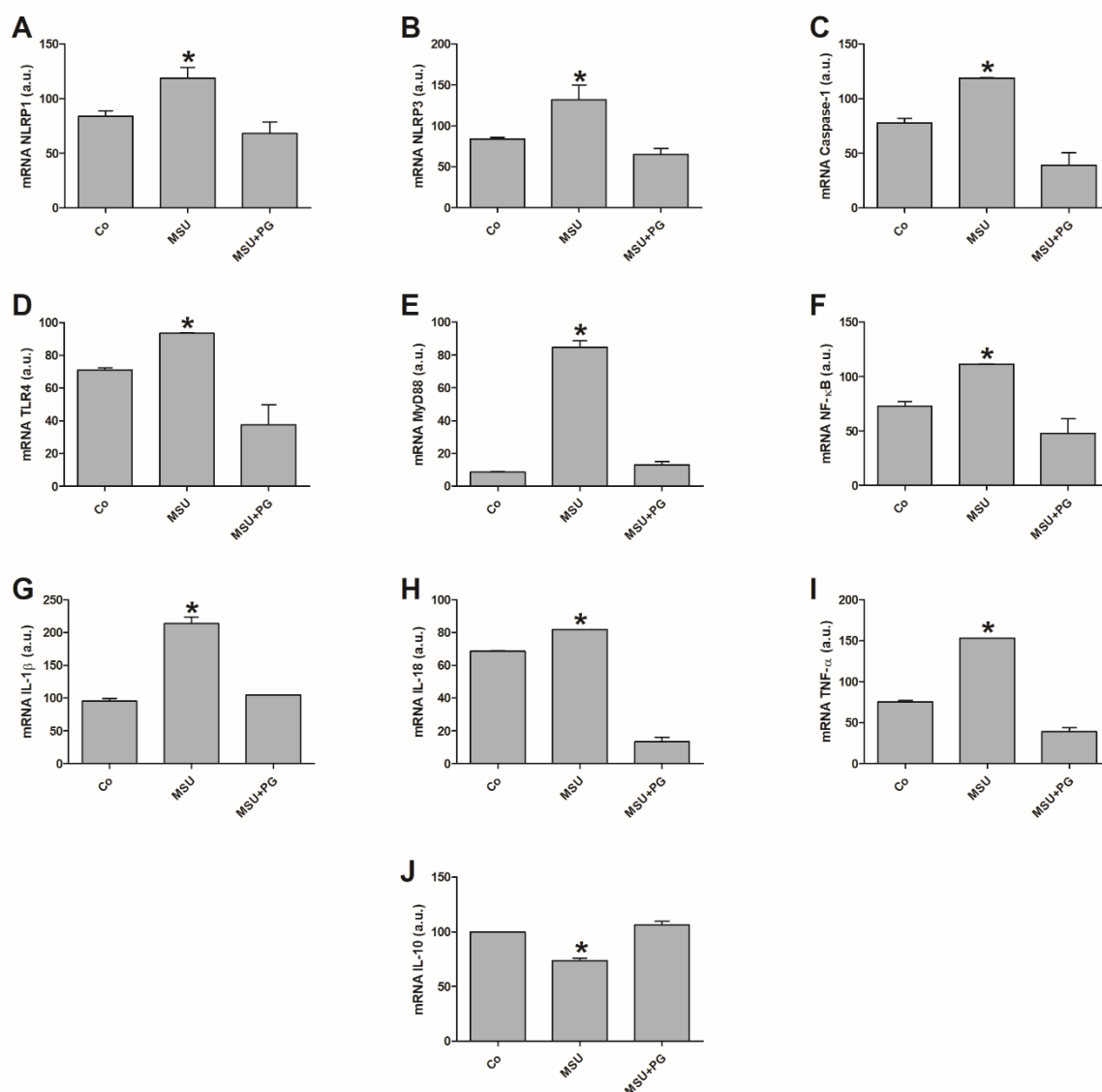


Figura 7. Expressão gênica de NLRP1 (A), NLRP3 (B), Caspase-1 (C), TLR4 (D), MyD88 (E), NF-κB (F), IL-1β (G), IL-18 (H), TNF-α (I) e IL-10 (J) em células THP-1 cultivadas na presença ou ausência de MSU e/ou PG. Resultados, obtidos de cinco experimentos independentes, foram expressos em média e desvio padrão em unidades arbitrárias (a.u.). * $p < 0.05$ vs. Co e MSU+PG (ANOVA).

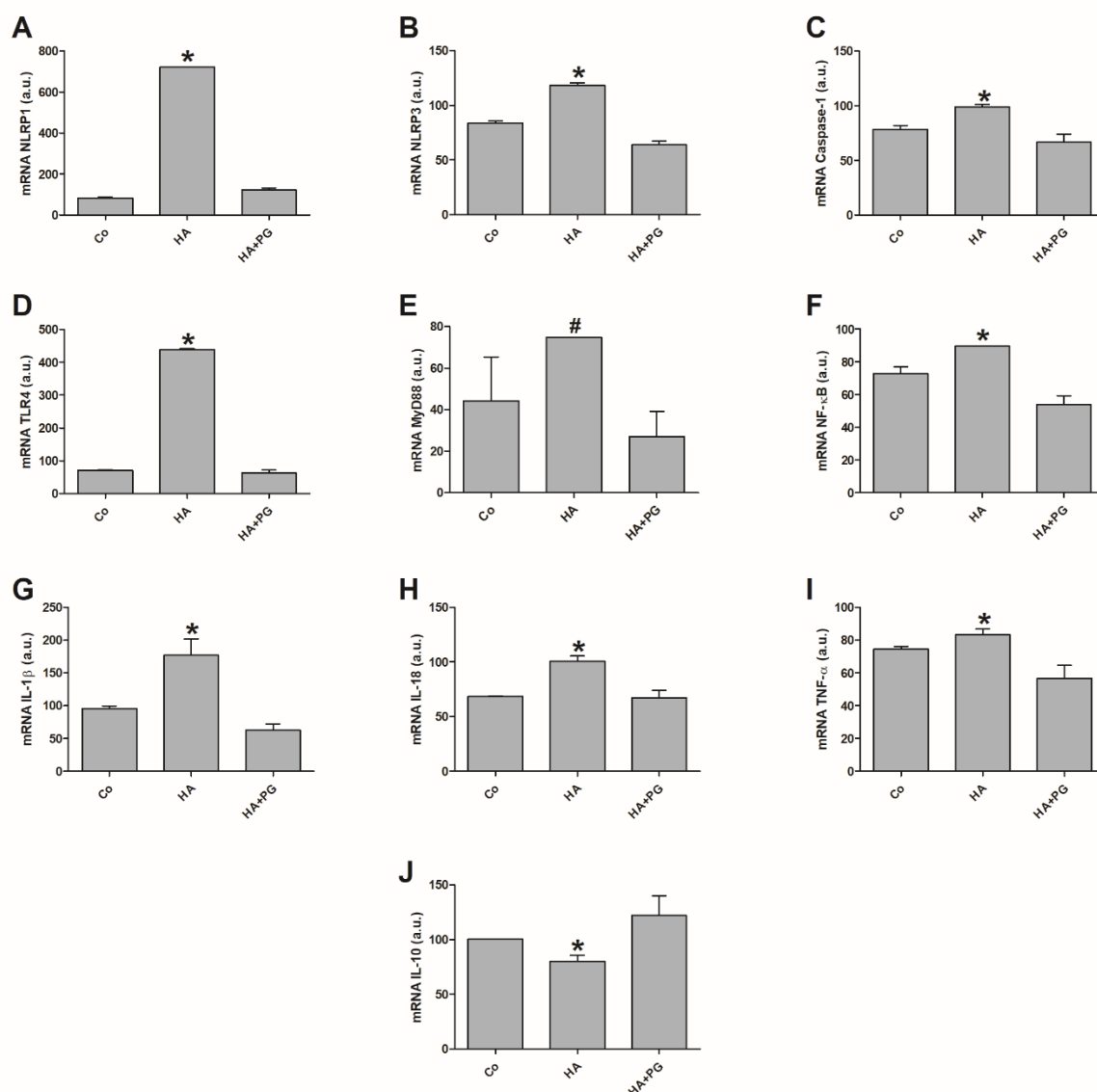


Figura 8. Expressão gênica de NLRP1 (A), NLRP3 (B), Caspase-1 (C), TLR4 (D), MyD88 (E), NF-κB (F), IL-1β (G), IL-18 (H), TNF-α (I) e IL-10 (J) em células THP-1 cultivadas na presença ou ausência de HA e/ou PG. Resultados, obtidos de cinco experimentos independentes, foram expressos em média e desvio padrão em unidades arbitrárias (a.u.). * p<0.05 vs. Co e HA+PG; # p<0.05 vs. HA+PG (ANOVA).

3.7. Determinação de citocinas em sobrenadante de cultura de células THP-1

Foi determinada a produção das citocinas IL-1β, IL-18, TNF-α e IL-10 por linhagem de células THP-1, estimuladas ou não com MSU ou HA e tratadas com PG.

O estímulo com MSU e HA aumentou os níveis proteicos de IL-1β, IL-18 e TNF-α em relação às culturas Co e tratadas com HA+PG (Figuras 7A-C e 8A-C). O tratamento das células com MSU, HA e PG não alterou a produção de IL-10 nas células THP-1 (Figuras 7D e 8D).

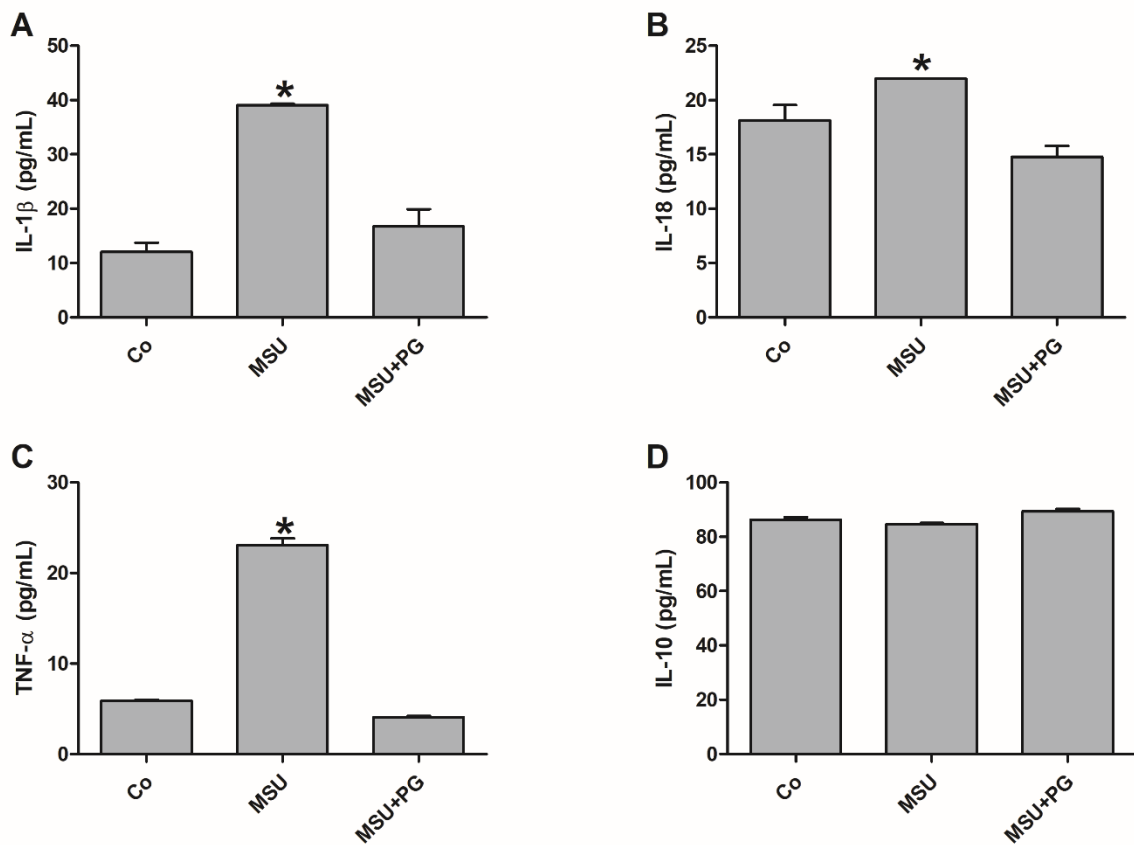


Figura 9. Produção de IL-1 β (A), IL-18 (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) por células THP-1 estimuladas com MSU e tratadas com progesterona (PG). Os resultados, obtidos de cinco experimentos independentes, foram expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. Co e MSU+PG (ANOVA).

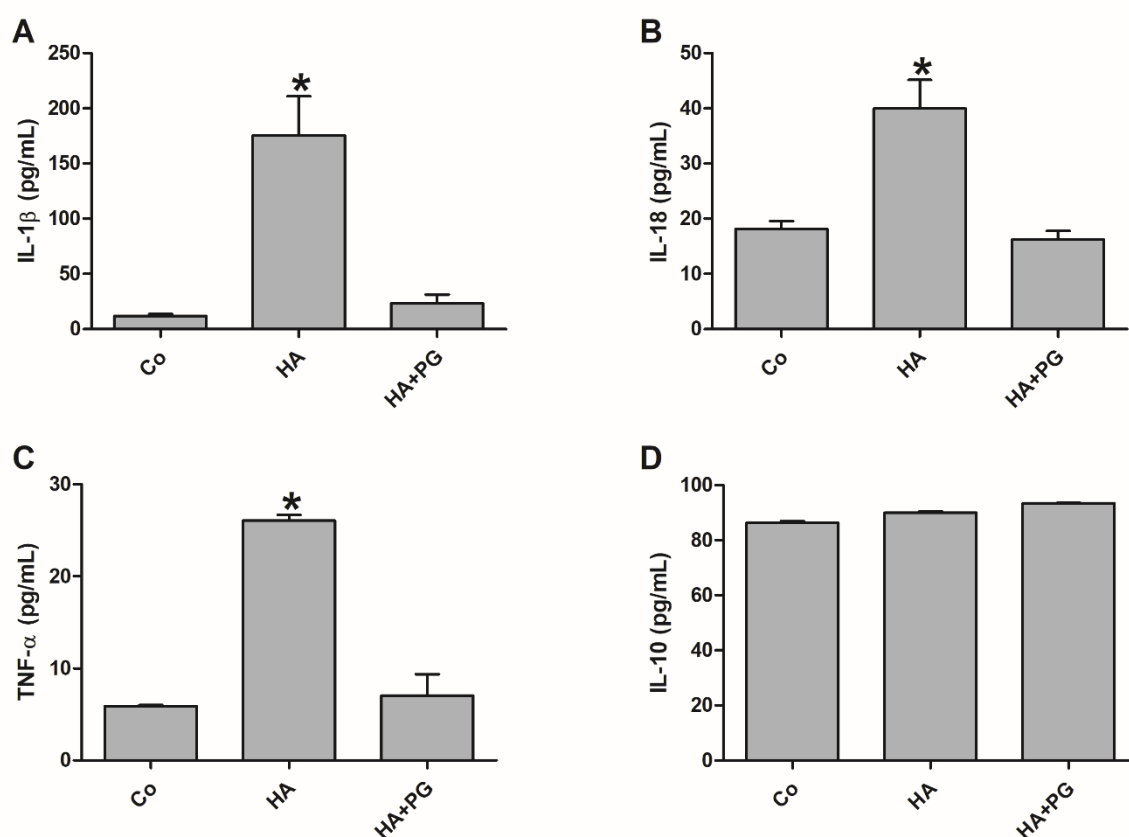


Figura 10. Produção de IL-1 β (A), IL-18 (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) por células THP-1 estimuladas com HA e tratadas com progesterona (PG). Os resultados, obtidos de cinco experimentos independentes, foram expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. Co e HA+PG (ANOVA).

4. Discussão

Recentes avanços na literatura têm sugerido que a inflamação sistêmica crônica e intensa, observada na PE, ocorre na ausência de infecção microbiana e pode ser considerada inflamação estéril (Nadeau-Vallée et al., 2016). Está relacionada à liberação de fatores endógenos decorrentes de injúria e morte celular pela placenta, conhecidos como DAMPs ou alarminas com potencial efeito modulador sobre a resposta imune, dirigindo-a para um perfil pró-inflamatório. Assim, os mecanismos inflamatórios desencadeados na PE são distintos dos observados na gestação normal e contribuem para a fisiopatologia dessa doença.

Ativação endógena de inflamassomas e de receptores TLR4 em monócitos de gestantes portadoras de PE tem sido descrita na PE associada à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-12, IL-18 e TNF- α e à presença de concentrações elevadas de DAMPs como ácido úrico, hialurona, HMGB1 e Hsp70 no

plasma dessas gestantes (Kim et al., 2005; Medeiros et al., 2014; Matias et al., 2015; Romão-Veiga et al., 2018). Cristais de ácido úrico e hialurona são potenciais ativadores dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3; entretanto, os mecanismos envolvidos nessa ativação não são bem conhecidos, assim como estudos empregando agentes moduladores capazes de regular essa atividade são escassos.

No presente estudo avaliamos o efeito imunomodulador da progesterona, importante hormônio da gestação, sobre a expressão dos inflamassomas NLRP1, NLRP3 e a via de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B em monócitos do sangue periférico obtidos de gestantes portadoras de PE. Além disso, a concentração de PG foi determinada no plasma de gestantes pré-eclâmpticas e de normotensas.

A comparação entre gestantes portadoras de PE e NT mostrou concentrações significativamente mais elevadas de ácido úrico e de hialurona no plasma de gestantes pré-eclâmpticas, corroborando com resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório (Matias et al., 2015; Romão-Veiga et al., 2018), enquanto os níveis de PG estavam diminuídos. A menor concentração plasmática desse hormônio está em acordo com resultados anteriores da literatura, mostrando redução dos níveis de PG tanto no plasma (Kiprono et al., 2013; Zhang et al., 2018) como no plasma e placenta de gestantes pré-eclâmpticas (Shin et al., 2018; Wan et al., 2018) e sugerem que essa deficiência de PG possa estar envolvida na patogênese da PE.

Os resultados do presente trabalho mostram que monócitos de gestantes portadoras de PE apresentam maior expressão gênica basal ou endógena dos receptores NLRP1, NLRP3 e de caspase-1, da via TLR4/MyD88/NF- κ B, de IL-1 β , IL-18 e TNF- α em relação às gestantes normotensas, sugerindo a participação das vias do inflamassoma e de TLR4 na inflamação sistêmica que caracteriza a PE. A via de sinalização do receptor TLR4 é uma das mais importantes na indução da resposta inflamatória sistêmica que contribui para a patogênese da PE (Abrahams et al., 2005). O tratamento dos monócitos com PG mostrou o efeito imunomodulador desse hormônio sobre a ativação endógena dessas células, diminuindo a expressão gênica dos componentes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e da via inflamatória TLR4/MyD88/NF- κ B no grupo de gestantes pré-eclâmpticas. Além disso, a PG também reduziu os níveis de IL-1 β , IL-18 e TNF- α produzidos por monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e a expressão proteica de TLR4 e NF- κ B, ao passo que aumentou a de I κ B α no grupo PE.

O efeito modulador da PG sobre a ativação de inflamassomas ainda é pouco estudado e não há relatos na literatura reportando seu efeito modulador sobre inflamassomas em gestantes portadoras de PE. Flores-Espinosa et al. (2014) mostraram que esse hormônio diminuiu a síntese e expressão de TLR4 e MyD88 e inibiu a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-8 em culturas de epitélio amniótico humano estimulado com lipopolissacáride. Evidências experimentais sobre os possíveis mecanismos pelos quais a PG pode modular TLR4 indicam que esse hormônio inibe a resposta imune inata mediada por TLR4 em macrófagos por meio da supressão da ativação de NF- κ B (Su et al., 2009).

Estudo *in vitro* realizado por Zhu et al. (2013) demonstrou que o tratamento de células mononucleares do sangue periférico obtidas de pacientes portadoras de PE com PG diminuiu, de forma dose-dependente, a expressão de RNAm de TLR4, MyD88 e NF- κ B e a produção de IL-6 e TNF- α por essas células. Esse hormônio, administrado em modelo de ratos com isquemia transitória local, 24 h após o início da isquemia, reduziu a expressão de RNAm dos inflamassomas NLRP3 e AIM2 induzida por hipóxia e diminuiu os níveis proteicos de ASC e NLRP3. As concentrações de IL-1 β , IL18 e TNF- α também foram reduzidas por esse hormônio esteroide. Além disso, foi demonstrado que a PG reduz a expressão de componentes do inflamassoma como ASC (Lammerding et al., 2016).

O estímulo de monócitos com MSU e HA de baixo peso molecular induziu maior expressão dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 nas células de gestantes portadoras de PE, mostrando que essas DAMPs são capazes de ativar esse complexo molecular e atuar na liberação de citocinas inflamatórias. Esses resultados confirmam dados obtidos anteriormente por nosso grupo e mostram que alarminas como cristais de ácido úrico e HA de baixo peso molecular, originada da degradação do ácido hialurônico, têm papel inflamatório na PE (Matias et al., 2015; Romão-Veiga et al., 2018). Considerando que níveis elevados de HA de baixo peso molecular estão presentes no plasma de gestantes portadoras de PE (Naruse et al., 2012; Romão et al., 2014; Romão-Veiga et al., 2018), é possível que essa DAMP induza a resposta pró-inflamatória na PE pela interação com receptores TLR2 e TLR4 (Scheibner et al., 2006; Ruppert et al., 2014) e ativação do inflamassoma NLRP3 (Yamasaki et al., 2009). Fragmentos de hialurona de baixo peso molecular interagem com receptores TLR, mediando a fosforilação de MAPK, a translocação de NF- κ B para o núcleo e a

produção de TNF- α (Jiang et al., 2011).

Foi observada maior atividade de NF- κ B fosforilado em monócitos de gestantes com PE em comparação com gestantes normotensas e diminuição dessa atividade após tratamento com PG. Complementando esses resultados, a ativação de NF- κ B esteve associada à maior expressão do receptor TLR4 e de I κ B α , proteína inibidora da via de NF- κ B, em monócitos de gestantes portadoras de PE. O estímulo com MSU e HA induziu aumento da ativação de NF- κ B e diminuiu a de I κ B α , enquanto o tratamento com PG exerceu o efeito contrário. Esses resultados confirmam os obtidos anteriormente em nosso laboratório mostrando que a atividade endógena de p65NF- κ B, detectada em extrato nuclear de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), foi significativamente maior em gestantes portadoras de PE do que em gestantes normotensas e mulheres saudáveis não grávidas (Giorgi et al., 2012).

A ativação de NF- κ B induzida por ácido úrico é observada em diversas doenças. O ácido úrico induz a inflamação renal na nefropatia gotosa via ativação de NF- κ B (Zhou et al., 2012; Lu et al., 2015), assim como ativa vias inflamatórias por meio da ativação de NF- κ B em células da musculatura lisa vascular de ratos (Kanellis et al., 2003; Lu et al., 2015). Cai et al. (2017) observaram que, após o tratamento de HUVECs com ácido úrico, houve diminuição do NF- κ B citoplasmático, ou seja, tal fator de transcrição nuclear foi ativado, bem como os sinais inflamatórios em células endoteliais. Dieta rica em ácido úrico aciona a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a ativação da via do NF- κ B no hipotálamo. Dados experimentais e clínicos indicam que a inflamação hipotalâmica mediada pelo NF- κ B pode estar implicada na patogênese de desordens metabólicas induzidas pelo ácido úrico (Lu et al., 2015).

Segundo Spiga et al. (2017), a exposição de células HepG2 (linhagem celular de hepatoma humano bem-diferenciado) ao ácido úrico resultou na ativação da via de sinalização I κ B quinase/I κ B α /NF- κ B. O tratamento de células HepG2 com ácido úrico ocasionou a fosforilação dose-dependente de IKK, I κ B α e da subunidade p65 do NF- κ B. Foi observado ainda que, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a hiperuricemia pode induzir a expressão de moléculas inflamatórias hepáticas por meio da ativação da cascata de sinalização pró-inflamatória NF- κ B (Spiga et al., 2017).

Os resultados do presente estudo mostram que a ativação endógena dos inflamassomas, bem como a via TLR4/MyD88/NF- κ B não se encontra ativada nos

monócitos de gestantes normotensas e o estímulo com MSU ou HA induziu apenas a expressão de TLR4 e de NF- κ B nas células dessas gestantes. A expressão gênica endógena de IL-10 por monócitos de gestantes portadoras de PE apresentou-se significativamente diminuída em comparação às gestantes normotensas e o tratamento das células com PG induziu aumento da expressão de RNAm dessa citocina nas células de gestantes pré-eclâmpticas, mas não alterou a expressão já aumentada de IL-10 nas gestantes normotensas. O predomínio da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 sobre as citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α por monócitos na gestação normal tem sido descrita (Cristofalo et al., 2013) e parece ter a função de minimizar os efeitos deletérios de uma resposta inflamatória excessiva, beneficiando o desenvolvimento fetal. Na PE essa regulação está prejudicada, observando-se diminuição de IL-10 e aumento de TNF- α , IL-1 β e IL-12 (Medeiros et al., 2014; Romão-Veiga et al., 2018).

A concentração plasmática elevada de IL-10 em gestantes normotensas descrita na literatura (Azizieh et al., 2005; Boreckci et al., 2007) pode ser explicada pelo desvio da resposta imune adaptativa para um perfil anti-inflamatório com predominância de subpopulações de linfócitos Th2 e T reguladores nessas gestantes, enquanto na PE ocorre o desvio para perfil inflamatório Th1 e Th17, com valores aumentados de IFN- γ , IL-6 e IL-17 e diminuídos de IL-10 e TGF- β 1 (Ribeiro et al., 2017). Assim, a adaptação materna à gestação requer interação controlada e harmônica entre as imunidades inata e adaptativa para permitir o crescimento e o desenvolvimento normais do feto (van Rign et al., 2008).

A ativação da via dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3, bem como a via TLR4/MyD88 e das citocinas inflamatórias foi reproduzida em linhagem de monócitos humanos THP-1, estimuladas por MSU e HA. Essas apresentaram perfil de resposta imune semelhante às culturas de monócitos de gestantes portadoras de PE. Os resultados obtidos do estímulo das células com MSU estão em acordo com os de Martinon et al. (2006), demonstrando que MSU induz aumento na expressão gênica de NLRP3 e caspase-1 nessa linhagem de monócitos humanos. Quando as células THP-1 foram estimuladas com MSU ou HA e tratadas com PG observou-se que a PG inibiu a ativação das vias do inflamassoma e do eixo TLR4/MyD88/NF- κ B, reduzindo a expressão gênica das citocinas inflamatórias e aumentando a expressão de IL-10. Esses efeitos imunomoduladores da PG também foram observados após o tratamento

de monócitos de gestantes portadoras de PE e confirmam o papel anti-inflamatório da PG sobre células da imunidade inata. Estudo recente avaliou efeitos da PG sobre a síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias por células mononucleares isoladas de sangue placentário de gestantes normais e estimuladas com LPS, com o objetivo de simular um ambiente inflamatório causada por infecção bacteriana. As células foram cultivadas na presença ou ausência de LPS e PG. O tratamento com PG induziu níveis elevados de IL-10 e diminuiu a secreção de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α nas células estimuladas com LPS, sugerindo que a PG pode modular a resposta imune nessas células e limitar os efeitos citotóxicos associados à infecção intrauterina (Preciado Martinez et al., 2018).

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho confirmam o estado de ativação endógena das vias TLR4/MyD88/NF- κ B e dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 em monócitos de gestantes portadoras de PE. Além disso, mostram que a PG é capaz de modular a inflamação estéril presente nessas células. A ativação de monócitos pelo MSU e HA, bem como a modulação pela PG foi confirmada por meio dos resultados obtidos das culturas de células THP-1, as quais obtiveram perfil de resposta imune semelhante às culturas de monócitos de gestantes portadoras de PE.

Portanto, o emprego de hormônios com ação imunomoduladora como a progesterona, para tratamento *in vitro* de monócitos de gestantes pré-eclâmpticas, permitirá melhor conhecimento dos processos envolvidos na inflamação sistêmica da PE e possivelmente propor formas alternativas para o tratamento dessa importante síndrome da gestação.

5. Referências

- Abrahams VM, Visintin I, Aldo PB, Guller S, Romero R, Mor G. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J Immunol*. 2005; 175(12):8096-104.
- Al-Ofi e, Coffelt SB, Anumba DO. Fibrinogen, an endogenous ligand of Toll-like receptor 4, activates monocytes in pre-eclamptic patients. *J Reprod Immunol*. 2014; 103: 23-28.
- Amaral LM, Cornelius DC, Harmon A, Moseley J, Martin JN Jr, LaMarca B. 17-hydroxyprogesterone caproate significantly improves clinical characteristics of preeclampsia in the reduced uterine perfusion pressure rat model. *Hypertension*. 2015; 65(1):225-31.
- Amaral LM, Kiprono L, Cornelius DC, Shoemaker C, Wallace K, Moseley J, Wallukat G, Martin JN Jr, Dechend R, LaMarca B. Progesterone supplementation attenuates hypertension and the autoantibody to the angiotensin II type I receptor in response to elevated interleukin-6 during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2014; 211(2):158.e1-6.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. Clinical Management Guidelines for Obstetrician–Gynecologists. Acog practice bulletin number 202. Gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2019; 133(1): e1-e25.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002; 277:15028-34.
- Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 58(3):268-79.
- Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 54(1):30-7.
- Berg S, Engman A, Holmgren S, Lundahl T, Laurent TC. Increased plasma hyaluronan in severe pre-eclampsia and eclampsia. *Scand J Clin Lab Invest*. 2001; 61:131-7.
- Borekci B, Aksoy H, Al RA, Demircan B, Kadanali S. Maternal serum interleukin-10, interleukin-2 and interleukin-6 in pre-eclampsia and eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 58(1):56-64.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11:309-16.
- Brien ME, Baker B, Duval C, Gaudreault V, Jones RL, Girard S. Alarmins at the maternal-fetal interface: involvement of inflammation in placental dysfunction and pregnancy complications. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018. doi: 10.1139/cjpp-2018-0363.
- Cai W, Duan X, Liu Y, Yu J, Tang Y, Liu Z, Jiang S, Zhang C, Liu J, Xu J. Uric acid induces

- endothelial dysfunction by activating the HMGB1/RAGE signaling pathway. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:4391920.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Nastasi G, Calatroni A. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol.* 2010; 80:480-90.
- Chen W, Qian L, Wu F, Li M, Wang H. Significance of Toll-like Receptor 4 Signaling in Peripheral Blood Monocytes of Pre-eclamptic Patients. *Hypertens Pregnancy.* 2015; 34(4):486-494.
- Chung E, Leinwand LA. Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovasc Res.* 2014; 101(4):561-70.
- Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, Peraçoli MT. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res.* 2013; 47: 268-275.
- Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, Overgaard MT, Tulac S, Dong J, Thomas P, Giudice LC. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J Endocrinol.* 2008;196(1):67-77.
- Engler JB, Kursawe N, Solano ME, Patas K, Wehrmann S, Heckmann N, Lühder F, Reichardt HM, Arck PC, Gold SM, Friese MA. Glucocorticoid receptor in T cells mediates protection from autoimmunity in pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(2):E181-E190.
- Flores-Espinosa P, Pineda-Torres M, Vega-Sánchez R, Estrada-Gutiérrez G, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Maida-Claros R, Paredes-Vivas Y, Morales-Méndez I, Sosa-González I, Chávez-Mendoza A, Zaga-Clavellina V. Progesterone elicits an inhibitory effect upon LPS-induced innate immune response in pre-labor human amniotic epithelium. *Am J Reprod Immunol.* 2014; 71(1):61-72.
- Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 2009; 10:241-7.
- Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF-κB pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol.* 2012; 95(1-2):67-72.
- Homer CS, Brown MA, Mangos G, Davis GK. Non-proteinuric pre-eclampsia: a novel risk indicator in women with gestational hypertension. *J Hypertens* 2008; 26:295– 302.
- Huppertz B, Kingdom J, Caniggia I, Desoye G, Black S, Korr H, Kaufmann P. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta.* 2003; 24(2-3):181-90.
- Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension.* 2008; 51(4):970-5.

- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* 2011; 91(1):221-64.
- Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P, Nakagawa T, Wamsley A, Sheikh-Hamad D, Lan HY, Feng L, Johnson RJ. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension.* 2003; 41(6):1287–93.
- Keiser SD, Veillon EW, Parrish MR, Bennett W, Cockrell K, Fournier L, Granger JP, Martin JN Jr, Lamarca B. Effects of 17-hydroxyprogesterone on tumor necrosis factor-alpha-induced hypertension during pregnancy. *Am J Hypertens.* 2009; 22(10):1120-5.
- Khan RN, Hay DP. A clear and present danger: inflammasomes DAMPING down disorders of pregnancy. *Hum Reprod Update* 2015; 21:388-405.
- Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, Nien JK, Gomez R, Mazor M, Saito S, Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193:921-7.
- Kiprono LV, Wallace K, Moseley J, Martin J Jr, Lamarca B. Progesterone blunts vascular endothelial cell secretion of endothelin-1 in response to placental ischemia. *Am J Obstet Gynecol.* 2013; 209(1):44.e1-6.
- Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2008; 15:231-42.
- Lammerding L, Slowik A, Johann S, Beyer C, Zendedel A. Post stroke inflammasome expression and regulation in the peri-infarct area by gonadal steroids after transient focal ischemia in the rat brain. *Neuroendocrinology.* 2016; 103(5):460-75.
- Li LB, Leung DYM, Hall CF, Goleva E. Divergent expression and function of glucocorticoid receptor β in human monocytes and T cells. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(4):818-827.
- Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A, Van der Post JA. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2009; 61(5):346-59.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
- Lu W, Xu Y, Shao X, Gao F, Li Y, Hu J, Zuo Z, Shao X, Zhou L, Zhao Y, Cen X. Uric Acid produces an inflammatory response through activation of NF- κ B in the hypothalamus: implications for the pathogenesis of metabolic disorders. *Sci Rep.* 2015; 16;5:12144.
- Mandrekar P, Catalano D, Jeliaskova V, Kodys K. Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for TNF-alpha regulation. *J Leukoc Biol.* 2008; 84:1335-45.
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals

- activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440: 237–241.
- Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, Araújo JP Jr, Peraçoli JC, de Oliveira L, Peraçoli MT. Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in pregnant women with preeclampsia. *PLoSOne*. 2015; 10(6):e0129095.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296:301-5.
- Medeiros LT, Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romão M, Weel IC, Golim MA, de Oliveira LG, Kurokawa CS, Medeiros Borges VT, Peraçoli MT. Monocytes from pregnant women with pre-eclampsia are polarized to a M1 phenotype. *Am J Reprod Immunol*. 2014; 72(1):5-13.
- Meis PJ. The role of 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate in the prevention of preterm birth. *Womens Health (Lond)*. 2006; 2(6):819-24.
- Merlob P, Stahl B, Klinger G. 17 α Hydroxyprogesterone caproate for prevention of recurrent spontaneous preterm birth. *Reprod Toxicol*. 2012;33(1):15-9.
- Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, Brien MÈ, Duval C, Chemtob S, Girard S. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction*. 2016; 152(6):R277-R292.
- Naruse K, Sado T, Noguchi T, Tsunemi T, Yoshida S, Akasaka J, Koike N, Oi H, Kobayashi H. Peripheral RAGE (receptor for advance glycation end products)-ligands in normal pregnancy and preeclampsia: novel markers of inflammatory response. *J Reprod Immunol*. 2012; 93:69-74.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001; 276:10229-33.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*. 2004; 279:7370-7.
- Pepe GJ, Albrecht ED. Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. *Steroids*. 1999; 64(9):624-7.
- Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 66(6):460-7.
- Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2013; 100(2):129-34.

- Preciado-Martínez E, García-Ruíz G, Flores-Espinosa P, Bermejo-Martínez L, Espejel-Nuñez A, Estrada-Gutiérrez G, Razo-Aguilera G, Granados-Cepeda M, Helguera-Repetto AC, Irlés C, Zaga-Clavellina V. Progesterone suppresses the lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in primary mononuclear cells isolated from human placental blood. *Immunol Invest.* 2018; 47(2):181-195.
- Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract.* 2013; 22 Suppl 1:8-19.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta.* 2003; 24(suppl A):S21-S27.
- Ribeiro VR, Romao-Veiga M, Romagnoli GG, Matias ML, Nunes PR, Borges VTM, Peracoli JC, Peracoli MTS. Association between cytokine profile and transcription factors produced by T-cell subsets in early- and late-onset pre-eclampsia. *Immunology.* 2017;152(1):163-173.
- Romão M, Weel IC, Lifshitz SJ, Peraçoli MT, Witkin SS. Elevated hyaluronan and extracellular matrix metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2014; 289:575-9.
- Romão-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Nunes PR, M Borges VT, Peraçoli JC, Peraçoli MTS. Induction of systemic inflammation by hyaluronan and hsp70 in women with pre-eclampsia. *Cytokine.* 2018; 105:23-31.
- Romero R, Yeo L, Chaemsathong P, Chaiworapongsa T, Hassan SS. Progesterone to prevent spontaneous preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014; 19(1):15-26.
- Ruppert SM, Hawn TR, Arrigoni A, Wight TN, Bollyky PL. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. *Immunol Res.* 2014; 58(2-3):186-92.
- Saïd-Sadier N, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J.* 2012; 35:437-49.
- Sammour MB, El-makhzangy MN, Fawzy MM, Schindler A. Progesterone therapy in pregnancy induced hypertension therapeutic value and hormonal profile. *Clin Exp Hypertens B.* 1982;1(4):455-78.
- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol.* 2006; 177:1272-81.
- Schindler AE. Progestogens for treatment and prevention of pregnancy disorders. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2010; 3(3):453-60.
- Shah NM, Imami N, Johnson MR. Progesterone Modulation of Pregnancy-Related Immune Responses. *Front Immunol.* 2018; 9:1293.

- Shin YY, Jeong JS, Park MN, Lee JE, An SM, Cho WS, Kim SC, An BS, Lee KS. Regulation of steroid hormones in the placenta and serum of women with preeclampsia. *Mol Med Rep.* 2018; 17(2):2681-2688.
- Spiga R, Marini MA, Mancuso E, Di Fatta C, Fuoco A, Perticone F, Andreozzi F, Mannino GC, Sesti G. Uric acid is associated with inflammatory biomarkers and induces inflammation via activating the NF- κ B signaling pathway in HepG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37:1241-1249.
- Su L, Sun Y, Ma F, Lü P, Huang H, Zhou J. Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett.* 2009; 125(2):151-5.
- Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 2014; 4:97-104.
- Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1972; 112(8):1095-100.
- Ugor E, Prenek L, Pap R, Berta G, Ernszt D, Najbauer J, Németh P, Boldizsár F, Berki T. Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression. *Immunobiology.* 2018; 223(4-5):422-431.
- van Rijn BB, Franx A, Steegers EA, de Groot CJ, Bertina RM, Pasterkamp G, Voorbij HA, Bruinse HW, Roest M. Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS One* 2008; 3:e1865.
- von Dadelszen P, Payne B, Li J, Ansermino JM, Broughton Pipkin F, Côté AM, Douglas MJ, Gruslin A, Hutcheon JA, Joseph KS, Kyle PM, Lee T, Loughna P, Menzies JM, Merialdi M, Millman AL, Moore MP, Moutquin JM, Ouellet AB, Smith GN, Walker JJ, Walley KR, Walters BN, Widmer M, Lee SK, Russell JA, Magee LA; PIERS Study Group. Prediction of adverse maternal outcomes in pre-eclampsia: development and validation of the full PIERS model. *PIERS Study Group. Lancet* 2011; 377:219–27.
- Walter LM, Rogers PA, Girling JE. The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomised mice. *Reproduction.* 2005 Jun;129(6):765-77.
- Wan J, Hu Z, Zeng K, Yin Y, Zhao M, Chen M, Chen Q. The reduction in circulating levels of estrogen and progesterone in women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2018; 11:18-25.
- Wu ZM, Yang H, Li M, Yeh CC, Schatz F, Lockwood CJ, Di W, Huang SJ. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. *Placenta.* 2012 Mar;33(3):188-94.

- Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Misaghi A, Hoffman HM, Gallo RL. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem.* 2009; 284(19):12762-71.
- Zainul Rashid MR, Lim JF, Nawawi NH, Luqman M, Zolkeplai MF, Rangkuty HS, Mohamad Nor NA, Tamil A, Shah SA, Tham SW, Schindler AE. A pilot study to determine whether progestogen supplementation using dydrogesterone during the first trimester will reduce the incidence of gestational hypertension in primigravidae. *Gynecol Endocrinol.* 2014; ;30(3):217-20.
- Zhang Q, Huang Y, Zhang K, Yan Y, Wu J, Wang F, Zhao Y, Xu H, Jiang W, Yu D, Chen Y, Ye D. Progesterone attenuates hypertension and autoantibody levels to the angiotensin II type 1 receptor in response to elevated cadmium during pregnancy. *Placenta.* 2018; 62:16-24.
- Zhou Y, Fang L, Jiang L, Wen P, Cao H, He W, Dai C, Yang J. Uric acid induces renal inflammation via activating tubular NF- κ B signaling pathway. *PLoS One.* 2012; 7(6):e39738.
- Zhu Y, Wu M, Wu CY, Xia GQ. Role of progesterone in TLR4-MyD88-dependent signaling pathway in pre-eclampsia. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2013; 33(5):730-4.
- Zhu L, Zhang Z, Zhang L, Shi Y, Qi J, Chang A, Gao J, Feng Y, Yang X. HMGB1-RAGE signaling pathway in severe preeclampsia. *Placenta.* 2015; 36:1148-52.

CAPÍTULO IV

Tratamento *in vitro* com vitamina D regula as vias do TLR4-MyD88-NF- κ B e dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e em células THP-1

Mariana Leticia Matias²; Mariana Romão-Veiga²; Vanessa Rocha Ribeiro²; Priscila Rezeck Nunes²; Virgínia Juliani Gomes²; Amanda Carreira Devides²; José Carlos Peraçoli²; Maria Terezinha Serrão Peraçoli¹.

¹Instituto de Biociências de Botucatu e ²Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP; Botucatu - São Paulo – Brasil

Resumo

A vitamina D (VD) é um hormônio esteroide essencial para manutenção da fisiologia osteomineral e metabolismo do cálcio. Estudos recentes mostram seu envolvimento na homeostase sistêmica e na regulação de processos imuno-inflamatórios dos sistemas imunes inato e adaptativo. A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação grave da gestação e está associada com ativação sistêmica de monócitos e geração de resposta inflamatória intensa, detectada por valores séricos elevados de citocinas inflamatórias. O presente trabalho avaliou, *in vitro*, o efeito imunomodulador da VD sobre as vias de sinalização dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 e de TLR4/MyD88/NF- κ B em monócitos de gestantes portadoras de PE e em linhagem celular de monócitos humanos THP-1. Monócitos obtidos do sangue periférico de 20 gestantes com PE, 20 gestantes normotensas e células THP-1 foram cultivados na presença ou ausência de urato monossódico (MSU), hialurona (HA) e vitamina D3 (VD) por diferentes períodos: a) por 30 min para determinação da fosforilação de NF- κ B e para expressão dos fatores intra-citoplasmáticos NF- κ B e I κ B α por citometria de fluxo, b) por 4h para a expressão gênica de TLR4, MYD88, NFKB1, NLRP1, NLRP3, CASP1, IL1B, IL18, TNF e IL10 analisada por RT-qPCR e c) por 18h para a determinação da concentração das citocinas IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-10 por ELISA e para expressão do receptor de superfície TLR4 por citometria de fluxo. Foram determinados os níveis plasmáticos de ácido úrico e VD em gestantes pré-eclâmplicas e normotensas. Os resultados foram analisados por meio de testes paramétricos e não-paramétricos com nível de significância de 5%. Os níveis plasmáticos de VD foram significativamente menores, enquanto os de ácido úrico foram maiores em gestantes com PE quando comparados com os de gestantes normotensas. Monócitos de gestantes pré-eclâmplicas apresentaram expressão gênica basal ou endógena de NLRP1, NLRP3, Caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, IL-1 β , IL-18 e TNF- α significativamente maior quando comparada com o grupo de normotensas. Tanto a expressão gênica como a proteica das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-18 e TNF- α foram significativamente maiores nas gestantes com PE do que nas normotensas, enquanto a expressão de IL-10 foi maior no grupo de normotensas. O tratamento das células com VD mostrou que esse hormônio regula negativamente a ativação endógena dos monócitos das gestantes pré-eclâmplicas por diminuir a ativação das vias dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 e do eixo de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B,

bem como a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-18 e TNF- α por essas células. A maior atividade basal de NF- κ B fosforilado observada em monócitos de gestantes com PE apresentou-se menor após o tratamento dessas células com VD. No grupo PE, os estímulos com MSU e HA aumentaram a expressão de TLR4 e NF- κ B e diminuíram a de I κ B α , enquanto o tratamento com VD teve efeito contrário. Os resultados do efeito imunomodulador da vitamina D3 sobre a ativação endógena dos monócitos obtidos de gestantes portadoras de PE foram reproduzidos nos experimentos com células THP-1, estimuladas com MSU e HA. O co-cultivo das células com MSU ou HA e vitamina D levou à diminuição da expressão dos genes inflamatórios nas células THP-1, mostrando o efeito regulador da vitamina D3 sobre a hiperativação das vias dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e do eixo TLR4/MyD88/NF- κ B induzida por MSU e HA. Esses resultados sugerem que a VD pode desempenhar papel importante na regulação da resposta inflamatória exacerbada na PE.

Palavras-chave: monócitos, pré-eclâmpsia, urato monossódico, hialurona, NF- κ B, inflamassomas NLRP1/NLRP3, vitamina D.

Abstract

Vitamin D is a steroid hormone essential for maintaining osteomineral physiology and calcium metabolism. Recent studies show their involvement in the systemic homeostasis and on the regulation of immunoinflammatory processes of the innate and adaptive immune systems. Preeclampsia (PE) is a serious complication of pregnancy that is associated with systemic activation of monocytes and generation of intense inflammatory response, detected by elevated serum levels of inflammatory cytokines. The present study evaluated in vitro the immunomodulatory effect of vitamin D3 (VD) on the signaling pathways of NLRP1/ NLRP3 inflammasomes and TLR4/MyD88/NF- κ B axis in monocytes from pregnant women with PE and in the human monocyte cell line THP-1. Monocytes obtained from the peripheral blood of 20 pregnant women with PE, 20 normotensive pregnant women and THP-1 cells were cultured with or without monosodium urate (MSU), hyaluronan (HA) and Vitamin D3 (VD) for different periods: a) for 30 min to determine the expression of NF- κ B phosphorylated and for expression of NF- κ B and I κ B α intracytoplasmic factors by flow cytometry, b) for 4 h to evaluate the gene expression of TLR4, MYD88, NFKB1, NLRP1, NLRP3, CASP1, IL1B, IL18, TNF and IL10 analyzed by qPCR and c) for 18 h to determine the concentration of IL-1 β , IL-18, TNF- α and IL-10 cytokines by ELISA, and the expression of TLR4 surface receptor by flow cytometry. Plasma levels of uric acid and VD were determined in preeclamptic and normotensive pregnant women. The results were analyzed using parametric and non-parametric tests with a significance level of 5%. Plasma levels of VD were significantly lower, whereas those of uric acid were higher in pregnant women with PE compared with normotensive pregnant women. Monocytes from preeclamptic pregnant women had baseline or endogenous expression of NLRP1, NLRP3, Caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, IL-1 β , IL-18 and TNF- α significantly higher when compared to the normotensive group. Both the gene and protein expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-18 and TNF- α were significantly higher in the pregnant women with PE than in the normotensive women, whereas IL-10 expression was higher in the normotensive group. Treatment of cells with VD showed that this hormone negatively regulates the endogenous activation of preeclamptic pregnant monocytes by decreasing the

activation of the NLRP1/NLRP3 inflammasomes pathways and the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling axis, as well as production of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-18 and TNF- α by these cells. The highest basal activity of phosphorylated NF- κ B observed in monocytes of pregnant women with PE was lower after the treatment of these cells with VD. In PE group, the MSU and HA stimuli increased the expression of TLR4 and NF- κ B and decreased that of I κ B α , whereas the treatment with VD had the opposite effect. The results of the immunomodulatory effect of vitamin D3 on the endogenous activation of monocytes obtained from pregnant women with PE were reproduced in the experiments with THP-1 cells, stimulated with MSU and HA. Co-cultivation of cells with MSU or HA and vitamin D led to a decrease in the expression of inflammatory genes in THP-1 cells, showing the regulatory effect of vitamin D3 on the hyperactivation of the inflammatory pathways NLRP1 and NLRP3, as well as the TLR4/MyD88/NF- κ B axis induced by MSU and HA. These results suggest that VD may play an important role in regulating the exacerbated inflammatory response in PE.

Keywords: monocytes, preeclampsia, monosodium urate, hyaluronan, NF- κ B, NLRP1/NLRP3 inflammasomes, vitamin D.

1. Introdução

A vitamina D (VD) é um pró-hormônio pertencente à categoria do grupo de vitaminas lipossolúveis, essencial para manutenção do esqueleto e absorção de cálcio. É sintetizada *in vivo*, na pele, quando a radiação solar ultravioleta B (UVB) interage com a molécula precursora, 7-deidrocolesterol, presente na derme e epiderme (Holick, 2007; Prietl et al., 2013), sendo armazenada e liberada pelas células de gordura (Rosen, 2011). Embora a produção endógena seja estimada em 90% do total de vitamina D em indivíduos saudáveis, uma pequena fonte de vitamina D é proveniente da ingestão e suplementação dietética (Holick et al., 2011; Awada et al., 2014; Fuleihan et al., 2015). Suas principais formas são vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colicalciferol) (Norman et al., 2007).

A forma ativa da vitamina D (1,25-(OH)₂D₃) regula a transcrição de um número expressivo de genes, que codificam proteínas transportadoras de cálcio e proteínas da matriz óssea, estando envolvida em processos biológicos, tais como metabolismo ósseo, modulação da resposta imune e regulação da proliferação e da diferenciação celular (Uitterlinden et al., 2004; Skrobot et al., 2018).

A vitamina D exerce efeitos sobre o sistema imune inato e adaptativo, gerando um “status” imune mais tolerogênico, particularmente por suas atividades reguladoras sobre a resposta inflamatória (Aranow, 2011; Prietl et al., 2013). Durante a gestação normal, a vitamina D é produzida por células trofoblásticas placentárias e da decídua humana, sendo responsável por um papel anti-inflamatório em vários órgãos, incluindo a placenta. Sendo assim, sugere-se que a deficiência de vitamina D pode contribuir para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia (PE) devido à falta de controle da inflamação nessa patologia (Xu et al., 2014).

A PE é a complicação mais comum e séria conhecida na gestação (Rahimi et al., 2018a). Esta síndrome da gravidez ocorre em 5 a 7% das gestações e está associada com morbidade materna e fetal, bem como mortalidade pré-natal (Rahimi et al., 2018b). Uma gestante é considerada portadora de PE quando, a partir da 20ª semana de gestação, apresenta ou não proteinúria superior ou igual à 300 mg/exame urina 24h associada às manifestações clínicas graves como valor de pressão arterial sistólica maior ou igual a 160 mmHg ou pressão arterial diastólica maior ou igual a 110 mmHg, insuficiência renal, comprometimento hepático, alterações neurológicas ou hematológicas e edema pulmonar na ausência de proteinúria. (Tranquilli et al., 2014;

ACOG, 2019).

A PE caracteriza-se por uma reação inflamatória sistêmica exacerbada (Borzychowski et al., 2006) e por ativação de células inflamatórias, como monócitos, granulócitos e células endoteliais (Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006), produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007), bem como alterações na produção de citocinas reguladoras, como IL-10, importante fator regulador da resposta inflamatória (Cristofalo et al., 2013).

Purswani et al. (2017) afirmam que a vitamina D possui papel chave na patologia instalada na PE, uma vez que influencia os níveis de pressão sanguínea por meio da homeostase do cálcio e da imunomodulação da inflamação e imunidade. Alguns estudos relatam deficiência de vitamina D em gestantes portadoras de PE (Robinson et al., 2013; Xu et al., 2014; Mohaghegh et al., 2015; Adela et al., 2017) enquanto outros mostram associação entre essa deficiência e o risco de desenvolvimento de PE (Bodnar et al., 2014; Baca et al., 2016; Serrano-Diaz et al., 2018), sugerindo que a suplementação com vitamina D pode proteger o organismo materno por sua influência sobre a função vascular e modulação da resposta imune (Hypponen et al., 2013; Skrobot et al., 2018).

A intensa resposta inflamatória sistêmica observada na PE está relacionada com a liberação de substâncias capazes de induzir inflamação por meio da ativação de células da imunidade inata e adaptativa (Redman & Sargent, 2004, Ribeiro et al., 2017). Essas substâncias são representadas por produtos endógenos celulares liberados durante lesão tecidual e denominados “sinais de perigo” ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (Kim et al., 2005), as quais podem estar presentes no plasma das gestantes. As DAMPs podem ser moléculas como ácido úrico, reativos intermediários do oxigênio, proteínas de choque térmico (Asea et al., 2002), proteínas liberadas de células mortas como *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) (Park et al., 2004) e produtos liberados da matriz extracelular, como fibronectina e hialurona (Yamasaki et al., 2009; Campo et al., 2010, Saïd-Sadier & Ojcius, 2012).

DAMPs como ácido úrico e hialurona podem se ligar aos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos em células da imunidade inata. Esses

receptores são considerados componentes centrais do sistema imune inato e estão envolvidos na resposta inflamatória de monócitos (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Os principais são os receptores semelhantes ao *Toll* (TLRs), que reconhecem e ligam DAMPs (Kim et al., 2005).

Outros receptores PRRs compreendem os membros da família de receptores Nod-like ou NLR (proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica), que são proteínas citosólicas capazes de reconhecer DAMPs citoplasmáticos e recrutar outras proteínas, formando complexos de sinalização denominados inflamassomas que promovem a inflamação e geram formas ativas de IL-1 β (Abbas et al., 2012). A ligação de cristais de ácido úrico como o urato monossódico (MSU) e hialurona de baixo peso molecular (HA) ativam receptores NLR, incluindo NLRP1 e NLRP3, que são responsáveis pela formação do inflamassoma (Lamkanfi et al., 2007). NLRP1 e NLRP3 são expressos em células imunes, mas também em outros tipos celulares como células placentárias (Abrahams, 2011; Pontillo et al., 2013).

Sabe-se que pacientes que desenvolvem PE possuem níveis plasmáticos elevados de ácido úrico, os quais se correlacionam com proteinúria elevada e gravidade da doença (Costa et al., 2012). O ácido úrico também tem potencial de promover inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial (Bainbridge & Roberts, 2008). Nesse sentido, observou-se correlação positiva entre o aumento da produção da citocina inflamatória TNF- α , de O $_2^-$ e concentração sérica elevada de ácido úrico em mulheres com PE (Peraçoli et al., 2011). Também se observou associação entre concentração plasmática elevada de ácido úrico, proteína de choque térmico Hsp70, IL-1 β , IL-12 e TNF- α nos casos graves dessa doença (Peraçoli et al., 2013).

Romão et al. (2014) demonstraram que HA, assim como o ácido úrico, também está aumentado no plasma de gestantes com PE em comparação com gestantes normotensas. Estudo de gestantes com eclâmpsia e PE grave demonstrou que HA está aumentado no plasma dessas pacientes (Berg et al. 2001), enquanto Uzun et al. (2010) observaram concentrações aumentadas de HA no sangue do cordão umbilical e na placenta de gestantes pré-eclâmplicas.

As DAMPs podem ativar diversas vias, sendo a resposta inflamatória induzida pela via de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B considerada uma das mais importantes na patogênese da PE (Akira et al., 2001; Kim et al., 2005; Liu et al., 2017). Comparando gestantes normotensas e pré-eclâmplicas, Giorgi et al. (2012)

demonstraram aumento da ativação de NF- κ B em células mononucleares do sangue periférico de gestantes portadoras de PE, associado à maior produção de TNF- α e IL-1 β . A maior produção dessas citocinas em gestantes com PE está em acordo com a literatura (Beckmann et al., 2004) e sugere que os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes de TNF- α podem estar associados às manifestações mais graves da PE (Peraçoli et al., 2007).

Matias et al. (2015) demonstraram que monócitos de gestantes pré-eclâmpicas apresentam maior expressão gênica endógena dos receptores NLRP1 e NLRP3 e de caspase-1, bem como da produção de IL-1 β e IL-18 em relação às gestantes normotensas, sugerindo a participação do inflamassoma NLRP3 na inflamação sistêmica que caracteriza a PE. O estímulo dessas células com MSU induziu maior expressão do inflamassoma NLRP3, mostrando que o ácido úrico é capaz de ativar esse complexo molecular e atuar na liberação de citocinas inflamatórias.

De maneira semelhante, estudos recentes de nosso laboratório mostraram que HA de baixo peso molecular induziu maior expressão gênica de NLRP1, NLRP3 e caspase-1, bem como aumento na produção de IL-1 β por monócitos de gestantes com PE (Romão-Veiga et al., 2018).

A literatura demonstra que a PE apresenta resposta inflamatória exacerbada, representada pela ativação de células da imunidade inata, com ativação de receptores extracelulares e intracelulares por meio das DAMPs, aumentando a produção de citocinas inflamatórias e resultando no aumento da inflamação, que é deletéria ao progresso da gestação. O entendimento da modulação das vias de ativação celular em monócitos humanos pela vitamina D poderá contribuir para a melhor compreensão do envolvimento da imunidade inata na fisiopatologia da PE e possivelmente propor formas alternativas para o tratamento dessa importante síndrome da gestação.

Sendo a inflamação sistêmica uma característica chave na PE, representada por ativação do complexo inflamassoma, concentrações excessivas de citocinas pró-inflamatórias associadas à redução de citocinas imunossupressoras e fenótipo anormalmente ativado das células do sistema imune, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, o efeito imunomodulador da vitamina D sobre a expressão dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 e a via TLR4/MyD88/NF- κ B em monócitos do sangue periférico de gestantes portadoras de PE e em linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

2. Material e Métodos

2.1. Casuística

Foram estudadas 20 primigestas portadoras de PE e 20 primigestas normotensas que realizaram a assistência ao parto na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. A idade gestacional dos grupos estudados foi estabelecida pela data da última menstruação e confirmada por exame ultra-sonográfico precoce (< 20 semanas de gestação).

Foi definida como portadora de PE, a gestante que, sem antecedente de hipertensão arterial, manifestou hipertensão arterial ($\geq 140 \times 90$ mmHg) associada à proteinúria (≥ 300 mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20ª semana de gestação (ACOG, 2019).

O tamanho amostral foi calculado, considerando-se a diferença de médias entre IL-1 β para gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, com base nos resultados apresentados em trabalho anterior (Matias et al., 2015). Considerando uma confiabilidade de 95%, poder de 90% e 20% de variabilidade nos valores de IL-1 β , o tamanho amostral foi de, no mínimo 20 indivíduos no grupo.

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo CAAE nº 56533616.4.0000.5411).

2.2. Critérios de inclusão

- Gestantes com PE: gestação única, com idade gestacional entre 28 e 40 semanas, diagnóstico de PE e sem qualquer outra intercorrência clínica ou obstétrica.
- Gestantes normotensas: gestação única, com idade gestacional entre 28 e 40 semanas e sem qualquer intercorrência clínica ou obstétrica.

2.3. Dosagem de 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.

2.4. Colheita de sangue

A colheita de sangue para determinação de ácido úrico e vitamina D e para a avaliação da expressão de moléculas relacionadas aos inflamassomas, fator de transcrição nuclear (NF- κ B), receptor TLR4 e produção de citocinas por monócitos de gestantes portadoras de PE foi feita no momento do diagnóstico da doença e, a de gestantes normotensas, no momento em que foram pareadas pela idade gestacional com as gestantes pré-eclâmpticas. Amostras de sangue (10 mL) foram coletadas por punção venosa da veia antecubital e foram colocadas em tubo plástico estéril contendo 10 U/mL de EDTA (Becton Dickinson-BD Vacutainer; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Após centrifugação por 10 min a 3000 g, o plasma obtido foi removido e alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento de sua utilização.

2.5. Dosagem de ácido úrico e vitamina D no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia e de gestantes normotensas

O ácido úrico foi determinado no plasma de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas por método enzimático, no sistema de automação Trinder (Biotrol Diagnostic) do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

A vitamina D, 25(OH)D, também foi determinada pelo método de quimiluminescência automatizada por micropartículas (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*, CMIA) com *Architect 25-OH Vitamin D assay Kit*, pelo analisador Architect® i2000 (Abbott®). A sensibilidade analítica é de 1,9 ng/mL e o coeficiente de variação intra e inter-ensaio é < 10%, segundo descrição do kit. O intervalo de referência é de 0.0 - 160.0 ng/mL, segundo o método. Foram considerados suficientes valores \geq 30 ng/mL, insuficiência de 21 a 29 ng/mL e deficiência < 20 ng/mL, segundo Bischoff-Ferrari e colaboradores (2006).

2.6. Isolamento e cultura de monócitos

O sangue periférico obtido das gestantes foi colocado em tubo estéril contendo EDTA (Greiner Bio-one, Americana - Brasil). As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), segundo a técnica descrita por Peraçoli et al. (2011). O anel rico em células mononucleares foi lavado com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 10 min a 200 g. Após esses procedimentos, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI para posterior contagem, utilizando-se o corante Turk 5% (1:1). Após contagem, a concentração celular foi ajustada para 1×10^7 PBMCs/mL. Para a separação de monócitos, foi utilizado o kit de Beads magnéticas por seleção negativa Pan Monocyte Isolation Kit, Human (Miltenyi Biotec, Germany) segundo orientações do fabricante, em colunas MS Columns (Miltenyi Biotec).

Após separação, os monócitos obtidos foram contados com solução de Turk 5% (1:1) e a concentração foi acertada conforme a quantidade de células necessária para cada método empregado.

2.7. Cultura de linhagem celular de monócitos humanos THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC nº. TIB 202) foi obtida do acervo do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos, Fiocruz mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) por no máximo 12 meses. As células foram descongeladas de criotubos. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS [137mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 2.7mM KCl (Sigma-Aldrich), 10mM Na_2HPO_4 (Merck) e 1.8mM KH_2PO_4 (Merck)] 1X pH 7.4. Para a manutenção celular foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), formulado com 0,2% (v/v) de NaHCO_3 (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% (v/v) de soro bovino fetal inativado (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e mantidas em garrafas T de 25 cm^2 (Corning, Corning, NY - USA) a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 por 3 dias. A concentração e viabilidade celular foram determinadas em hemocítmetro por microscopia óptica (100x) utilizando-se a diluição de 1:50 em azul de tripan 0,4% (Gibco/Thermo Fisher Scientific). No preparo das células para a realização dos experimentos, as células foram removidas do meio de cultura original, lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10%

(v/v) de soro bovino fetal. Após a quantificação, as células foram ressuspensas na concentração de 5×10^5 células/mL em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal.

2.8. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de monócitos e de células THP-1

Para avaliar a produção de IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-10, monócitos de gestantes (5×10^5 monócitos/mL) e as células THP-1 (5×10^5 células/mL), obtidos conforme descrito nos itens 2.6 e 2.7, respectivamente, foram incubados a 37°C, em tensão de 5% de CO₂ por 18 h, na presença ou ausência de 50 μ g/mL de MSU (Sigma-Aldrich) ou 100 μ g/mL de HA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ou de 100 nM de VD (Sigma-Aldrich). As concentrações de MSU e HA foram previamente padronizadas em cultura de monócitos de mulheres saudáveis, não grávidas e empregadas conforme descrito em trabalhos anteriores do grupo (Matias et al., 2015; Romão-Veiga et al., 2018). O sobrenadante obtido após 18 h de cultivo foi aspirado, centrifugado a 600 g e distribuído em alíquotas, que foram conservadas a -80°C até o momento da dosagem das citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA).

2.9. Determinação de p65NF- κ B fosforilado

Para avaliar o efeito da vitamina D (VD) sobre a ativação de p65NF- κ B fosforilado, monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e de normotensas (5×10^5 células/ml) foram cultivados por 30 minutos na presença ou ausência de vitamina D (100 nM). Os monócitos foram então submetidos à extração nuclear utilizando-se *Cell Lysis Buffer 1x* (Cell Signaling Technology, Danvers, MA – USA) com a adição de PMSF (1 mM) por 5 min. Após esse período, o extrato foi centrifugado à 14000 g por 10 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado à -80°C. A concentração total de proteína nos extratos foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Para avaliar a ativação de NF- κ B, foi empregado o PathScan Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) Sandwich ELISA kit (Cell Signaling Technology), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de p65NF- κ B encontrada foi dividida pela quantidade de proteína total presente nessas células e os resultados expressos em

µg de p65-NF-κB/µg de proteína.

2.10. Avaliação da expressão de transcritos relacionados à inflamação

Os monócitos de gestantes (5×10^5 monócitos/mL) e as células THP-1 (5×10^5 células/mL) foram cultivados na presença ou ausência de MSU, HA, e VD por 4 h, nas concentrações já citadas no item 2.8 e, posteriormente submetidos à análise da expressão, em nível transcricional, dos genes que codificam as proteínas NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, MyD88, NF-κB, IL-1β, IL-18, TNF-α e IL-10. O RNA total dos monócitos e das células THP-1 foram extraídos por meio do sistema Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Canada), conforme protocolo do fabricante. Após a extração, a fim de garantir a completa remoção de DNA genômico, 1µg de RNA total foi incubado com DNase I Amp Grade (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). A pureza e qualidade relativa de todas as amostras de RNA total obtidas foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente, a síntese de DNA complementar (cDNA) para execução da Reação em Cadeia da Polimerase acoplada a transcrição reversa (*Reverse Transcription-coupled Polymerase Chain Reaction* – RT-PCR) foi realizada com 450 ng de RNA total por 60 µl de reação, utilizando ImProm-II™ Reverse Transcription System, conforme protocolo do fabricante.

A quantificação da expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, MyD88, NF-κB, IL-1β, IL-18, TNF-α e IL-10 foi efetuada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com Matias et al. (2015). O aparelho utilizado foi 7500 Fast Real-time PCR Systems (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

As diversas variantes dos alvos estudados foram alinhadas no programa MEGA 5.05 e, posteriormente, cada iniciador foi escolhido por meio do programa Primer-BLAST. Para cada alvo, foram selecionados iniciadores localizados na junção éxon-éxon. Iniciadores presentes em tal junção garantem a pureza da reação, ou seja, a ausência de qualquer DNA genômico que possa contaminá-la. As sequências dos iniciadores utilizadas no presente estudo estão detalhadas no Quadro 1.

Quadro 2. Sequências dos iniciadores para a análise da expressão dos genes NLRP1, NLRP3, CASP1, TLR4, MYD88, NFKB1, IL1B, IL18, TNF e IL10 em estudo por qPCR.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	GenBank
NLRP1	(1728)TCCGGCTCCCATTAGACAGA(1747)	(1810)AGACCCATCCTGGCTCATCT(1791)	NM_033004.3
NLRP3	(2826)GAGGAAAAGGAAGGCCGACA(2845)	(2917)TGGCTGTTACCAATCCATGA(2897)	NM_004895.4
CASP1	(1065)AGACATCCCACAATGGGCTC(1084)	(1172)TGAAAATCGAACCTTGCGGAAA(1151)	NM_033292.3
TLR4	(2274)TGCTTCTTGCTGGCTGCATA(2293)	(2359)CCAGTCCTCATCCTGGCTTG(2340)	NM_138554.4
MYD88	(263)GTCTCCTCCACATCCTCCCT(282)	(344)TCCGCACGTTCAAGAACAGA(325)	NM_001172567.1
NFKB1	(1072) TGCAGCAGACCAAGGAGATG(1091)	(1211) TGCATTGGGGGCTTTACTGT (1192)	NM_003998.3
IL1B	(544)GAGCAACAAGTGGTGTCTCC(564)	(653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)	NM_000576.2
IL18	(438)ACTGTAGAGATAATGCACCCCG(459)	(517)AGTTACAGCCATACCTCTAGGC(496)	NM_001562.3
TNF	(325)GCTGCACTTTGGAGTGATCG(344)	(462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)	NM_000594.3
IL10	(361)AAGACCCAGACATCAAGGCG(380)	(445)ATTCGATGACAGCGCCGTAG(426)	NM_000572.2
GAPDH	(684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703)	(801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	NM_002046.4

2.11. Análise da expressão de TLR4, NF-κB e IκB por meio da técnica de citometria de fluxo

Monócitos de gestantes portadoras de PE, de normotensas e de células THP-1 foram cultivados na presença ou ausência de MSU, HA, e VD por 30 minutos, nas mesmas concentrações já citadas no item 2.8, para análise da expressão dos fatores intra-citoplasmáticos NF-κB e IκBα e por 18 horas para a análise do receptor de superfície TLR4. A concentração celular foi ajustada para 2×10^5 células/mL e as células distribuídas em tubos Falcon para citômetro (BD Bioscience). As células foram incubadas com anticorpos BD Biosciences, com os respectivos fluorocromos: anti-CD14 (Alexa FLuor 488) e anti-TLR4 (PE) por 30 min, no escuro. Após centrifugação, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de ázida sódica e 1% de soro bovino fetal e centrifugadas novamente por 10 min a 400g. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando Fix Buffer (BD) e Perm Buffer (BD) para incubação com anticorpos marcados com fluorocromos específicos contra as proteínas intracelulares NF-κB (PE-Cy7) e IκBα (Alexa FLuor 647), por 30 min, no escuro e em temperatura ambiente. Para cada teste, tubos controles foram incubados com anticorpos isotípicos específicos para cada fluorocromo (Alexa FLuor 488, PE, PE-Cy7 e Alexa Fluor 647). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo modelo

FACSCanto™ (BD) usando programa “FlowJo” (FlowJo Enterprises, Ashland, OR, USA) para adquirir e analisar multiparâmetros celulares. Foi padronizada a aquisição de 30.000 eventos por amostra, sendo otimizada a população de interesse, estabelecendo-se *gate* (janela) com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL) de CD14. A partir desse *gate*, estabelecido nos monócitos positivos para CD14, a média de intensidade de fluorescência (MIF) de TLR4, NF-κB e IκBα foi avaliada.

2.12. Determinação de citocinas pela técnica de ELISA

Para quantificação das citocinas IL-1β, IL-18, TNF-α e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de monócitos e cultura de células THP-1, foi empregado ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se kits comerciais específicos (R&D Systems).

Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonais e policlonais, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas-padrão, foram recomendadas pelo fabricante. O limite de sensibilidade dos kits foi de 1,0 pg/ml para IL-1β, 5,15 pg/ml para IL-18, 4,0 pg/ml para TNF-α e 3,9 pg/ml para IL-10.

2.13. Análise estatística

Os resultados foram avaliados empregando-se testes paramétricos ou não-paramétricos, segundo o programa estatístico PRISM, (Graph Prism, versão 6.01, GraphPad, CA, EUA). A avaliação das características clínicas e dosagens plasmáticas das gestantes portadoras de PE e de normotensas foram realizadas pelo teste de U de Mann-Whitney. A comparação dos resultados de expressão gênica e proteica de monócitos submetidos a diferentes tratamentos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn. A análise dos resultados obtidos das células THP-1 foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

A análise das características clínicas e laboratoriais das gestantes portadoras de PE e das normotensas mostrou não haver diferença estatística entre os grupos avaliados, com relação aos parâmetros de idade e idade gestacional (Tabela 1). O valor da pressão arterial sistólica e diastólica, bem como as concentrações de proteinúria e ácido úrico foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no grupo de gestantes com PE do que em gestantes normotensas. A concentração plasmática de vitamina D, por sua vez, mostrou-se menor no grupo de gestantes portadoras de PE em comparação com as normotensas.

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e de gestantes normotensas.

Características	Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (n = 20)	Gestantes normotensas (n = 20)
Idade (anos)	26 (17 – 41)	27 (18 – 40)
Idade gestacional (semanas)	34 (23 – 39)	35 (23 – 40)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	160*(140 – 200)	110 (90 – 112)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	110*(90 – 120)	69 (63 – 70)
Proteinúria (mg/urina 24h)	2960* (320 – 22520)	< 300
Ácido úrico (mg/dL)	6.0* (4.1 – 10.1)	3.2 (2.3 – 4.7)
Vitamina D (ng/mL)	24.2* (13.4 – 26.5)	29.5 (23.6 – 43.5)

Os valores estão expressos em mediana, com os valores mínimo e máximo entre parênteses. * ($p < 0,05$) gestantes normotensas (teste *U* de Mann-Whitney).

3.2. Expressão gênica de monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas

Realizou-se a quantificação relativa da expressão dos genes para NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-18 e IL-10 em monócitos de 20 gestantes portadoras de PE e 20 gestantes normotensas (NT), estimulados com MSU ou HA e tratados ou não com VD.

A expressão gênica basal de NLRP1, NLRP3, Caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, IL-1 β , IL-18 e TNF- α (Figura 1A-I) foi significativamente maior em monócitos de

gestantes com PE quando comparados com o grupo NT. MSU e HA aumentaram a expressão de todos os genes estudados, exceto IL-10, em monócitos de PE em comparação com as culturas controle, não estimuladas (Co) e culturas tratadas com VD. O tratamento de monócitos com VD, por sua vez, diminuiu a expressão desses genes no grupo PE (Figura 1A-I). Não houve diferença significativa na expressão dos genes relacionados aos inflamassomas e citocinas inflamatórias em monócitos de gestantes normotensas estimulados com as DAMPs ou tratados com VD, contudo, MSU e HA induziram maior expressão gênica de TLR4, MyD88 e NF- κ B no grupo NT (Figura 1D-F).

Quanto à expressão do gene que codifica a citocina anti-inflamatória IL-10, monócitos de gestantes pré-eclâmpticas apresentaram menor expressão endógena quando comparadas com gestantes normotensas (Figura 1J). O cultivo de monócitos de gestantes com PE na presença de MSU ou HA diminuiu a expressão do gene da IL-10, enquanto o tratamento dessas células com VD levou ao seu aumento. No grupo NT, os monócitos cultivados com MSU, mostraram menor expressão gênica de IL-10 comparado aos monócitos controle (Co) (Figuras 1J).

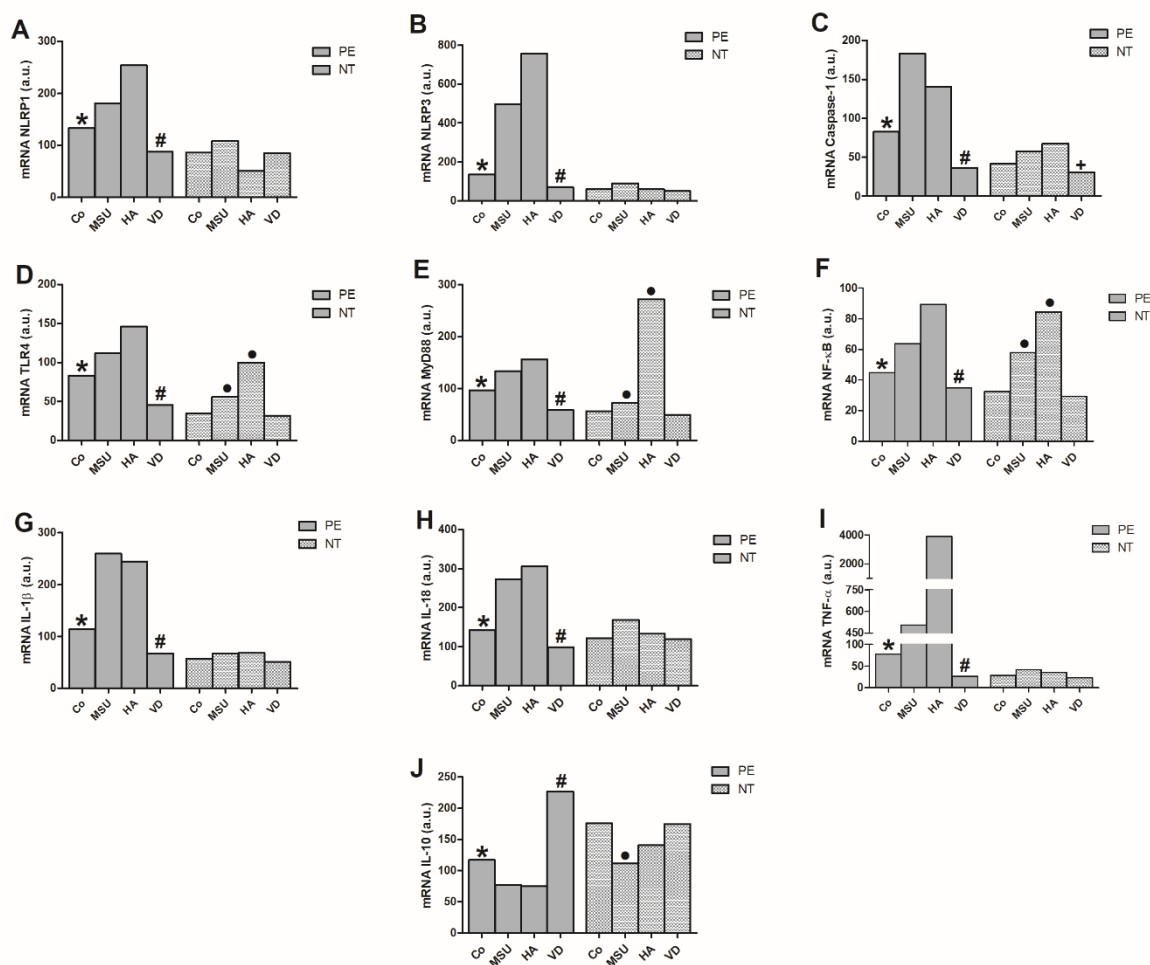


Figura 11. Expressão gênica de NLRP1 (A), NLRP3 (B), Caspase-1 (C), TLR4 (D), MyD88 (E), NF-κB (F), IL-1β (G), IL-18 (H), TNF-α (I) e IL-10 (J) em monócitos de 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e 20 gestantes normotensas (NT), cultivados na presença ou ausência de urato monossódico (MSU), hialurona (HA) ou vitamina D (VD). Resultados foram expressos em mediana de unidades arbitrárias (a.u.). * $p < 0.05$ vs. PE MSU, PE HA, PE VD e NT Co; # $p < 0.05$ vs. PE MSU e PE HA; • $p < 0.05$ vs. NT Co e NT VD; + $p < 0.05$ vs. NT MSU e NT HA (Teste de Kruskal-Wallis).

3.3. Determinação de citocinas em sobrenadante de cultura de monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas

A produção das citocinas IL-1β, IL-18, TNF-α e IL-10 por monócitos de 20 gestantes portadoras de PE e 20 gestantes normotensas, estimulados ou não com MSU ou HA e tratados com VD está representada na Figura 2.

Observou-se concentração basal de IL-1β, IL-18 e TNF-α produzida por monócitos de gestantes portadoras de PE significativamente mais elevada em relação ao grupo NT (Figura 2A-C), enquanto a concentração de IL-10 foi menor (Figura 2D).

Os níveis proteicos de IL-1 β e IL-18 apresentaram aumento devido à adição de MSU e HA na cultura de monócitos de gestantes portadoras de PE. Já o tratamento com VD diminuiu esses níveis. Monócitos de gestantes normotensas (NT) produziram maior quantidade de IL-1 β quando estimulados com MSU e HA (Figura 2A-B).

O estímulo com MSU acentuou os níveis proteicos de TNF- α em relação à produção endógena (Co) no grupo PE, no entanto, a adição de HA à cultura não foi capaz de causar aumento significativo (Figura 2C). O tratamento com VD, por sua vez, diminuiu a produção de TNF- α nas pacientes com PE (Figuras 2C). Em relação ao grupo NT, monócitos dessas gestantes produziram maiores níveis de TNF- α quando estimulados com MSU e HA (Figura 2C).

É possível observar que a produção de IL-10 não apresentou alteração com a adição de MSU, HA ou VD nas culturas de monócitos de gestantes com PE e de gestantes normotensas (Figuras 2D).

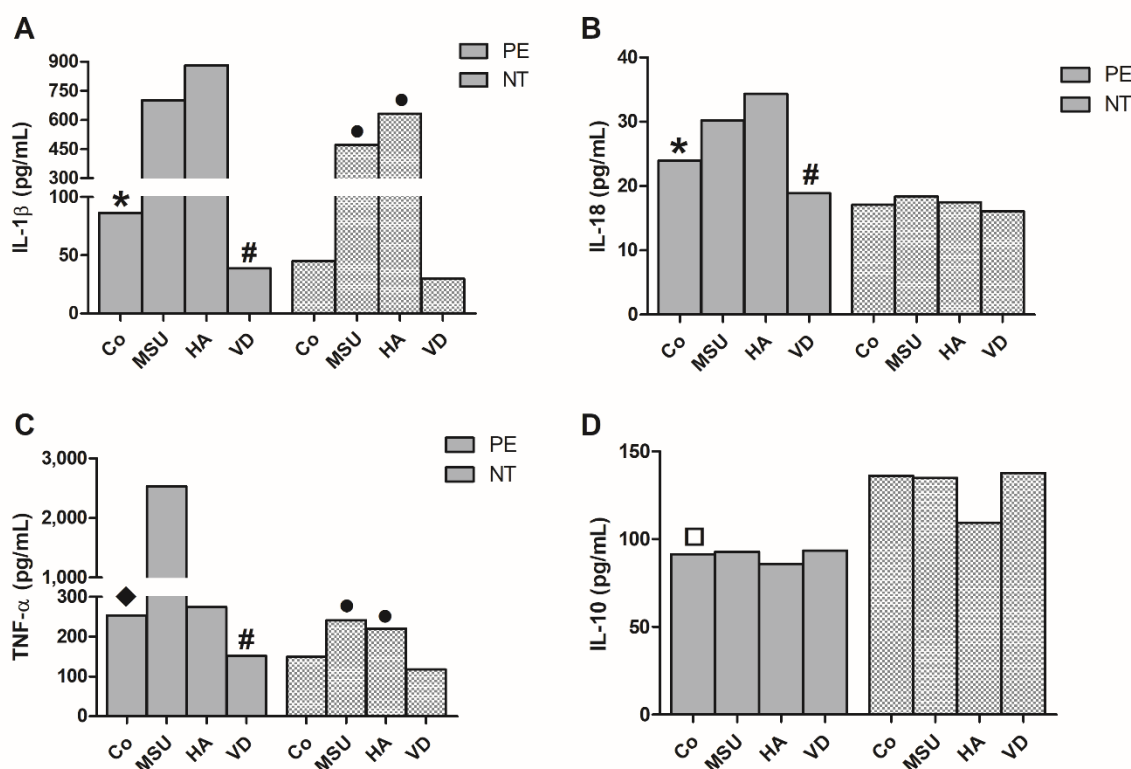


Figura 12. Produção IL-1 β (A), IL-18 (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) por monócitos de 20 gestantes com pré-eclâmpsia (PE) e de 20 gestantes normotensas (NT), cultivados na presença ou ausência de urato monossódico (MSU), hialurona (HA) ou vitamina D (VD). Resultados foram expressos em mediana. * $p < 0.05$ vs. PE MSU, PE HA, PE VD e NT Co; # $p < 0.05$ vs. PE MSU e PE HA; • $p < 0.05$ vs. NT Co e NT VD; ♦ $p < 0.05$ vs. PE MSU, PE VD e NT Co; □ $p < 0.05$ vs. NT Co (Teste de Kruskal-Wallis).

3.4. Análise da expressão do receptor TLR4 e dos fatores intracitoplasmáticos NF- κ B e I κ B α em monócitos de gestantes de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas

A análise da via TLR4/MyD88/NF- κ B por citometria de fluxo mostrou que monócitos de gestantes com PE apresentaram maior expressão endógena de TLR4 e NF- κ B e menor expressão de I κ B α quando comparada ao grupo de gestantes NT (Figura 3A-C).

O cultivo de monócitos de gestantes pré-eclâmpticas com MSU e HA não causou aumento da expressão de TLR4, enquanto o tratamento com VD diminuiu seu nível (Figura 3A). No grupo das gestantes normotensas, o estímulo dos monócitos com MSU e HA induziu maior expressão de TLR4 em relação às culturas controle (Co) e tratadas com VD (Figura 3A).

O nível proteico de NF- κ B apresentou aumento devido à adição de MSU e HA na cultura de monócitos de gestantes portadoras de PE. Já o tratamento com VD diminuiu esses níveis (Figura 3B).

Monócitos de gestantes com PE cultivados na presença de MSU e HA apresentaram diminuição da expressão de I κ B α , enquanto o tratamento com VD aumentou esse nível. Monócitos de gestantes NT também expressaram menores quantidades de I κ B α quando estimulados com MSU e HA (Figura 3C).

A determinação proteica de NF- κ B fosforilado presente na fração nuclear de monócitos, realizada pela técnica de Elisa, mostrou maior concentração endógena de NF- κ B fosforilado em monócitos de gestantes portadoras de PE do que em gestantes NT. Além disso, monócitos de gestantes pré-eclâmpticas apresentaram menores níveis de NF- κ B fosforilado após tratamento com VD. Não houve diferença significativa entre os grupos das gestantes normotensas (Figura 3D).

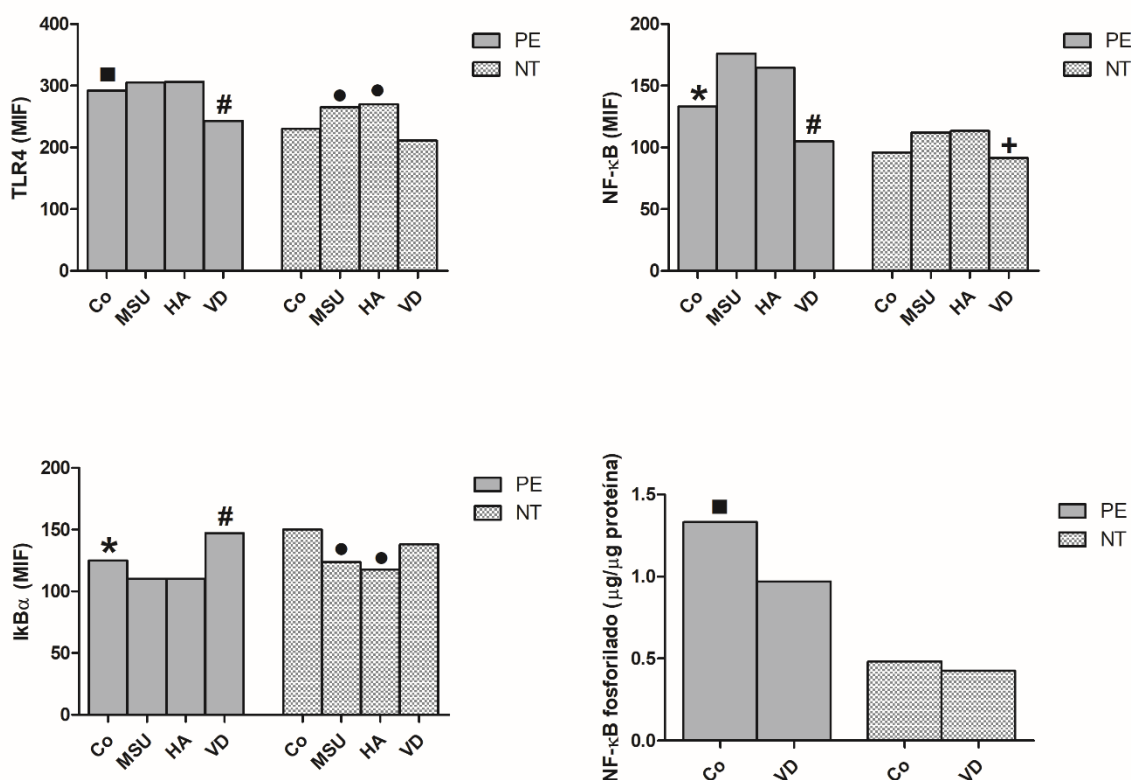


Figura 13. Expressão do receptor de superfície TLR4 e dos fatores intra-citoplasmáticos NF-κB e IκBα e atividade do NF-κB fosforilado em monócitos de 20 gestantes com pré-eclâmpsia (PE) e de 20 gestantes normotensas (NT), cultivados na presença ou ausência de urato monossódico (MSU), hialurona (HA) ou vitamina D (VD). Resultados foram expressos em mediana. * $p < 0.05$ vs. PE MSU, PE HA, PE VD e NT Co; # $p < 0.05$ vs. PE MSU e PE HA; • $p < 0.05$ vs. NT Co e NT VD; ■ $p < 0.05$ vs. PE VD e NT Co (Teste de Kruskal-Wallis).

3.5. Expressão gênica de células THP-1

Realizou-se a quantificação relativa da expressão dos genes para NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, MyD88, NF-κB, TNF-α, IL-1β, IL-18 e IL-10 em células THP-1 estimuladas ou não com MSU e HA e tratadas com VD.

O cultivo de THP-1 na presença de MSU e HA aumentou a expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, NF-κB, TNF-α, IL-1β e IL-18 e diminuiu a expressão de IL-10 quando comparado com as culturas Co e tratadas com MSU+VD/HA+VD. A vitamina D diminuiu a expressão dos genes inflamatórios em células THP-1 cultivadas na presença de MSU ou HA (Figuras 4 e 5).

Também é possível observar que houve diferença significativa na expressão gênica de MyD88 entre as células THP-1 cultivadas com MSU e as culturas Co e MSU+VD (Figura 4E) e entre os grupos HA e HA+VD (Figura 5E). Em relação à IL-10,

o tratamento com VD aumentou a expressão gênica dessa citocina quando comparado com estímulo com MSU (Figura 4J), mas não interferiu no tratamento com HA+VD (Figura 5J).

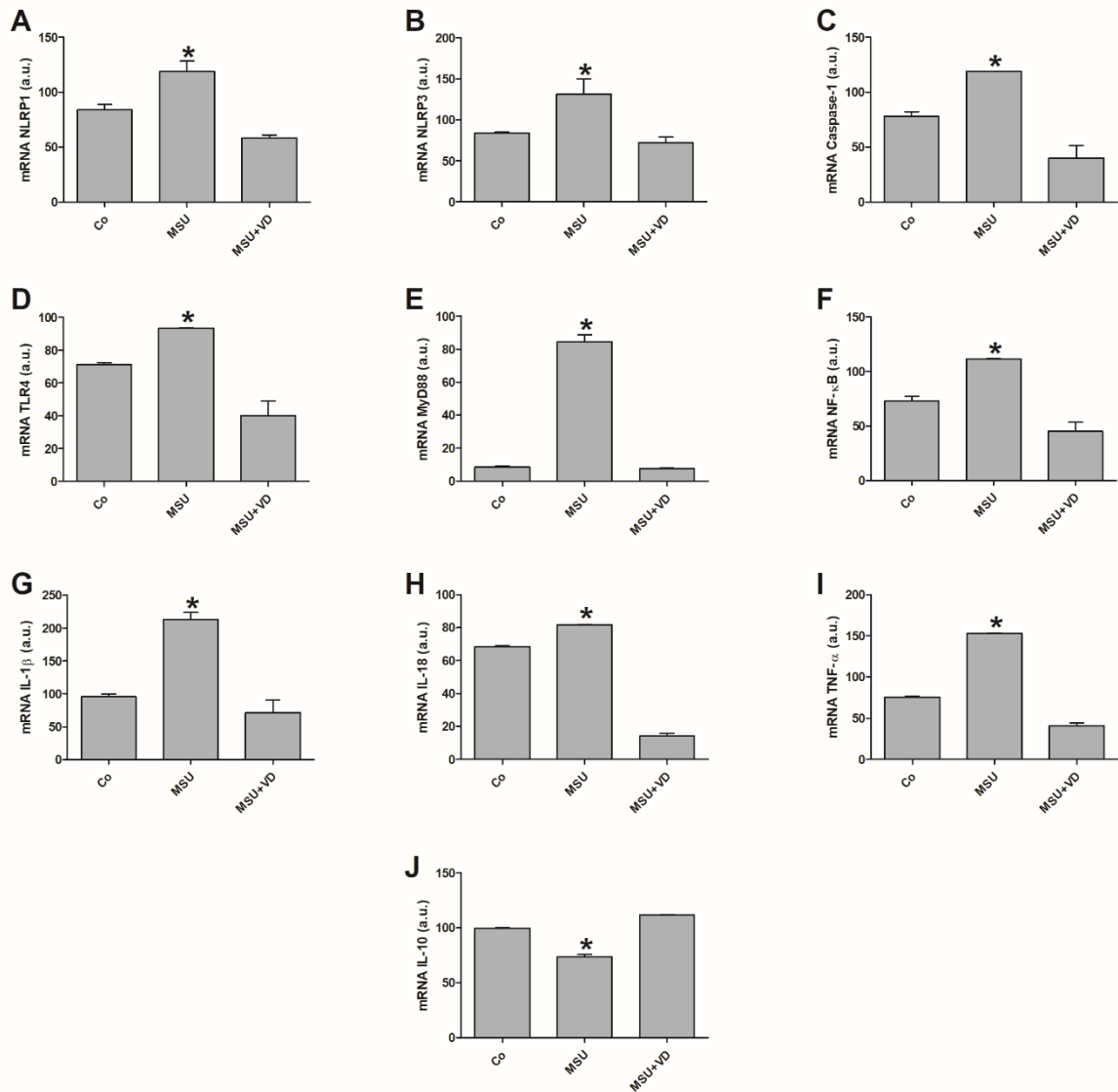


Figura 4. Expressão gênica de NLRP1 (A), NLRP3 (B), Caspase-1 (C), TLR4 (D), MyD88 (E), NF-κB (F), IL-1β (G), IL-18 (H), TNF-α (I) e IL-10 (J) em células THP-1 cultivadas na presença ou ausência de MSU e/ou VD. Resultados, obtidos de cinco experimentos independentes, foram expressos em média e desvio padrão em unidades arbitrárias (a.u.). * p<0.05 vs. Co e MSU+VD (ANOVA).

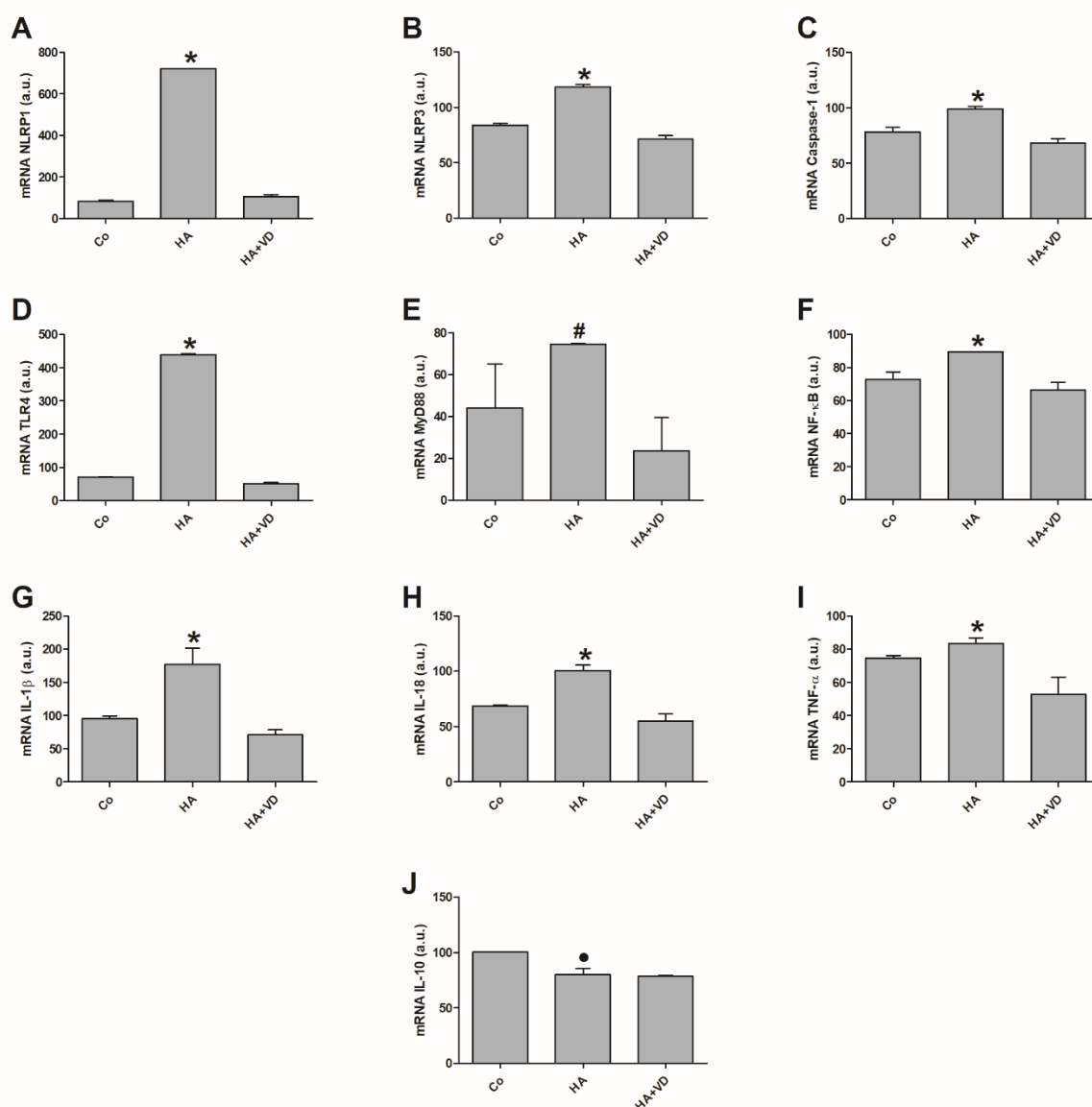


Figura 5. Expressão gênica de NLRP1 (A), NLRP3 (B), Caspase-1 (C), TLR4 (D), MyD88 (E), NF-κB (F), IL-1β (G), IL-18 (H), TNF-α (I) e IL-10 (J) em células THP-1 cultivadas na presença ou ausência de HA e/ou VD. Resultados, obtidos de cinco experimentos independentes, foram expressos em média e desvio padrão em unidades arbitrárias (a.u.). * $p < 0.05$ vs. Co e HA+VD; # $p < 0.05$ vs. HA+VD; • $p < 0.05$ vs. Co (ANOVA).

3.6. Determinação de citocinas em sobrenadante de cultura de células THP-1

Foi determinada a produção das citocinas IL-1β, IL-18, TNF-α e IL-10 por linhagem de células THP-1, estimuladas ou não com MSU ou HA e tratadas com VD.

O estímulo das células com MSU e HA aumentou os níveis proteicos de IL-1β, IL-18 e TNF-α em relação às culturas Co e tratadas com MSU+VD ou HA+VD (Figuras 6A-C e 7A-C), porém não alterou a produção de IL-10 nas células THP-1 (Figuras 6D

e 7D).

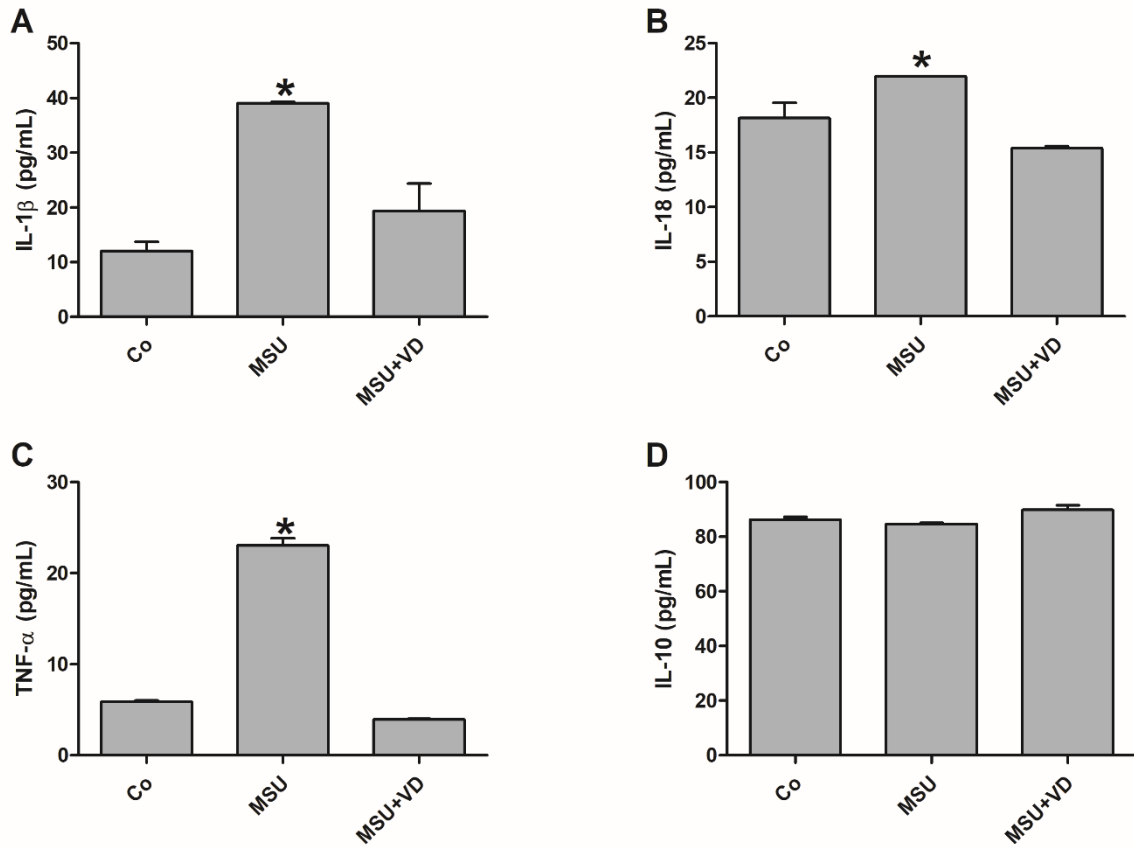


Figura 6. Produção e IL-1 β (A), IL-18 (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) por células THP-1 estimuladas com MSU e tratadas com vitamina D (VD). Os resultados, obtidos de cinco experimentos independentes, foram expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. Co e MSU+VD (ANOVA).

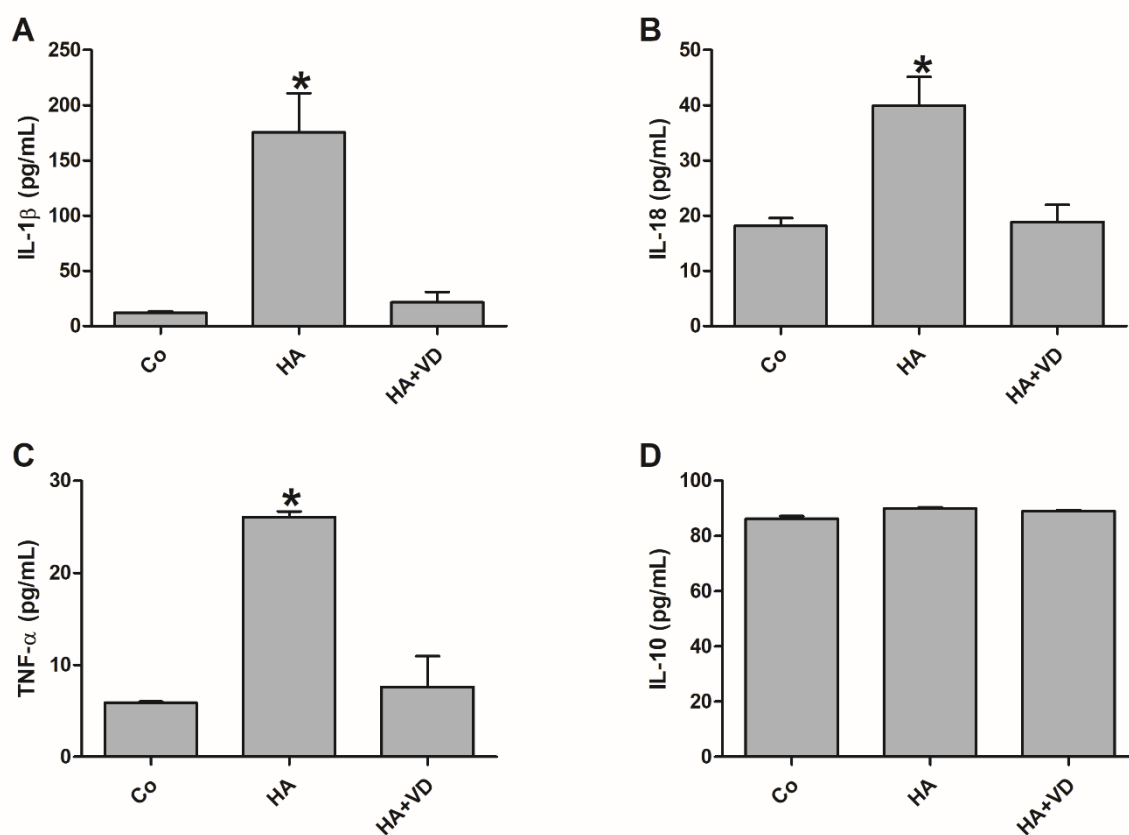


Figura 7. Produção e IL-1 β (A), IL-18 (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) por células THP-1 estimuladas com HA e tratadas com vitamina D (VD). Os resultados, obtidos de cinco experimentos independentes, foram expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ vs. Co e HA+VD (ANOVA).

4. Discussão

O presente estudo avaliou, *in vitro*, o efeito imunomodulador da vitamina D3 sobre o estado inflamatório de monócitos de gestantes portadoras de PE. O mecanismo envolvido nesse efeito foi determinado em linhagem celular de monócitos humanos, THP-1, submetida à indução do processo inflamatório por MSU e HA e tratadas com vitamina D3.

Os resultados mostram que monócitos de gestantes pré-eclâmpticas apresentam expressão gênica basal ou endógena de NLRP1, NLRP3, Caspase-1, TLR4, MyD88, NF- κ B, IL-1 β , IL-18 e TNF- α significativamente maior em monócitos de gestantes com PE quando comparados com o grupo NT. Tanto a expressão gênica como protéica das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-18 e TNF- α foram significativamente maiores nas gestantes com PE do que nas normotensas, enquanto a expressão de IL-10 foi maior no grupo de normotensas.

O tratamento das células com vitamina D3 mostrou que esse hormônio regula negativamente a ativação endógena dos monócitos das gestantes pré-eclâmpticas, por diminuir a ativação das vias dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 e do eixo de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B. Observou-se diminuição da expressão de genes relacionados aos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e da produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-18 e TNF- α após o tratamento dessas células com vitamina D3. Esses resultados mostram que esse hormônio pode regular a ativação desses inflamassomas e diminuir a síntese de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos das gestantes portadoras de PE, devido seu efeito sobre células da imunidade inata.

Não há relatos na literatura avaliando o efeito da vitamina D sobre inflamassomas em células ou tecidos de gestantes pré-eclâmpticas. Em trabalhos anteriores do grupo demonstramos que monócitos de gestantes com PE apresentam ativação endógena da via dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3, contribuindo para a inflamação sistêmica da PE (Matias et al., 2015). Além disso, a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 e seus componentes se encontra aumentada em tecido placentário dessas gestantes, bem como ocorre maior expressão proteica de citocinas inflamatórias (Weel et al., 2017). O efeito regulador da vitamina D sobre a expressão e secreção de TNF- α e IL-6 por células trofoblásticas obtidas de placenta de gestantes pré-eclâmpticas, cultivadas com diferentes concentrações desse hormônio foi descrito por Noyola-Martinez et al. (2013). Os autores enfatizam o papel do calcitriol no controle da resposta imune na interface materno-fetal, particularmente em patologias da gestação como a PE.

O efeito modulador da vitamina D3 sobre o inflamassoma NLRP3 nos monócitos das gestantes pré-eclâmpticas confirma estudos realizados por Dai et al. (2018). Os autores demonstraram o papel do calcitriol na inibição do eixo de sinalização ROS-NLRP3-IL-1 β em células epiteliais da córnea humana cultivadas em ambiente inflamatório. A vitamina D, claramente, suprimiu a expressão de genes relacionados ao inflamassoma NLRP3 e a produção de IL-1 β nessas células após exposição ao estresse hiperosmótico (Dai et al., 2018). Outras evidências mostram que esse hormônio imunomodulador é capaz de inibir a ativação do inflamassoma NLRP3 em população de células T auxiliares em pacientes com esclerose múltipla (Peelen et al., 2015). Assim, a vitamina D também exerce efeito regulador sobre células da imunidade adaptativa, conforme já descrito anteriormente (Di Rosa et al., 2013;

Ysmail-Dahlouk et al., 2016). Esse hormônio pode atuar como agente anti-inflamatório sobre linfócitos T diminuindo sua proliferação e a produção de citocinas como IFN- γ , IL-2 e IL-17 (Alroy et al., 1995; Van Etten & Mathieu, 2005; Ysmail-Dahlouk et al., 2016), e desempenhar importante papel na prevenção e controle de resposta imune pro-inflamatória e de doenças autoimunes (Sheikn et al., 2018).

Nossos resultados mostram que a via de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B está endogenamente mais expressa em monócitos de gestantes portadoras de PE quando comparadas com gestantes normotensas. Após tratamento com vitamina D3, tais células pertencentes à imunidade inata apresentaram diminuição da expressão gênica dos componentes desse eixo inflamatório, bem como diminuição da expressão protéica de TLR4, NF- κ B fosforilado e citocinas inflamatórias e aumento de I κ B α .

O aumento da expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL-10 em monócitos de gestantes com PE induzida por vitamina D3 associado à diminuição da expressão de citocinas inflamatórias e da menor expressão protéica de TLR4 e NF- κ B fosforilado corroboram achados recentes da literatura. Zhang et al. (2018) demonstraram que a administração *in vivo* de vitamina D3 reduz a resposta inflamatória em modelo experimental de asma em camundongos pela inibição da via de sinalização HMGB1/TLR4/NF- κ B. A inoculação de vitamina D nos animais atenuou os sintomas da asma, reduziu significativamente os níveis séricos de IL-1 β , IL-6, TNF- α e aumentou os de IL-10 nos animais tratados em comparação ao grupo controle positivo da asma. Além disso, regulou a expressão proteica de HMGB1, TLR4, NF- κ B e a expressão de p65NF- κ B fosforilado.

De maneira semelhante, monócitos de pacientes portadores de diabetes tipo 1 tratados com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ apresentaram produção aumentada de IL-10 e IL-4, enquanto diminuíram a de citocinas inflamatórias como IL-17 e INF- γ , sugerindo que a forma ativa da vitamina D pode reverter a ativação de vias inflamatórias no início dessa doença (Ysmail-Dahlouk et al., 2016). Em modelo experimental de diabetes, a inoculação de vitamina D3 por via intraperitoneal em camundongos atenuou a periodontite pela redução de glicose sanguínea, de hemoglobina glicada e de níveis de TNF- α , levando à diminuição de perda óssea alveolar. Os resultados sugerem que a vitamina D3 melhora a periodontite diabética pela diminuição da sinalização TLR4 e JAK1/STAT3 no epitélio gengival, podendo contribuir como terapia potencial para pacientes com essa doença (Wang et al., 2013).

Há estudos que relatam o papel imunomodulador da vitamina D em diversas doenças inflamatórias. Qiao et al. (2017) mostraram que a via de sinalização TLR4/NF- κ B possui papel importante na patogênese da asma e que quantidades apropriadas de vitamina D exercem efeito regulador sobre essa via. O receptor TLR4 exerce importante papel na doença inflamatória denominada displasia broncopulmonar (BPD) e parece ser regulado pela vitamina D (Yao et al., 2017). Em modelo experimental de BPD, o aumento de TLR4 induzido por hiperóxia foi regulado pela vitamina D, inibindo, assim, a inflamação (Yao et al., 2017). Em conjunto, os resultados da literatura demonstram o papel regulador anti-inflamatório da vitamina D sobre a via de sinalização TLR4-NF- κ B.

Os resultados do efeito imunomodulador da vitamina D3 sobre a ativação endógena dos monócitos obtidos de gestantes portadoras de PE foram reproduzidos nos experimentos com células THP-1, estimuladas com moléculas indutoras de inflamação, as DAMPs urato monossódico (MSU) e hialurona (HA). O cultivo de células THP-1 na presença de MSU e HA aumentou a expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, TLR4, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β e IL-18 e diminuiu a expressão de IL-10 quando comparado com as culturas controle, não estimuladas. Níveis significativamente elevados de ácido úrico e hialurona foram descritos no plasma de gestantes portadoras de PE quando comparadas às gestantes normotensas (Peraçoli et al., 2011; Romão et al., 2014; Romão-Veiga et al., 2018) e parecem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da resposta inflamatória sistêmica nessas gestantes.

Essas DAMPs induzem inflamação estéril por meio da interação com receptores de reconhecimento de padrão TLR expressos na superfície ou com receptores intracitoplasmáticos da família NLR, presentes em células da imunidade inata (Taylor et al., 2004; Kim et al., 2005; Franchi et al., 2009), resultando na manutenção do estado inflamatório intenso observado na PE (Khan & Hay, 2015).

O co-cultivo das células com MSU ou HA e vitamina D levou à diminuição da expressão dos genes inflamatórios nas células THP-1, mostrando o efeito regulador da vitamina D3 sobre a hiperativação das vias dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3, bem como do eixo TLR4/MyD88/NF- κ B induzida por MSU e HA. Esses resultados sugerem que esse hormônio tem papel importante na regulação da resposta inflamatória em células da imunidade inata.

Estudos avaliando o efeito modulador da vitamina D sobre a expressão de receptores TLR em células THP-1 são escassos. Verma et al. (2014) demonstraram que o tratamento dessas células com vitamina D3 (1,25 (OH)₂ D3) induz aumento da expressão de TLR10 e diminui a de TLR2, TLR4 e TLR5 por essas células. A ativação de TLR10 por vitamina D3, que exerce efeito imunossupressor em monócitos, sugere que a função de TLR10 pode ser diferente da descrita para os outros TLR estudados e pode desempenhar papel regulador sobre monócitos humanos.

Em conjunto, os resultados do presente trabalho mostram o efeito imunomodulador da vitamina D3, atenuando a ativação endógena dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e da via de sinalização TLR4/NF-κB nos monócitos de gestantes portadoras de PE e nas células THP-1 e sugerem que a intensa inflamação sistêmica observada nas gestantes portadoras de PE poderia ser decorrente de um desequilíbrio da homeostase do sistema imune, causado pela ausência de fatores reguladores da resposta inflamatória como a Vitamina D. Na literatura há muitos relatos de que gestantes portadoras de PE apresentaram níveis plasmáticos de vitamina D significativamente menores quando comparados com gestantes normotensas. Assim, a menor concentração desse hormônio no plasma das gestantes pré-eclâmpticas em comparação as gestantes normotensas, detectada no presente estudo, corrobora os resultados da literatura (Robinson et al., 2013; Xu et al., 2014; Bakacak et al., 2015; Mohaghegh et al., 2015; Adela et al., 2017), sugerindo que a suplementação da vitamina D poderia proteger o organismo materno por seu efeito modulador sobre a resposta imune inata, que se encontra alterada na PE.

5. Referências

- Abbas AK, Lichtman A, Pillai S. Imunidade inata. In: *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 7^a.ed, 2012; p55-68.
- Abrahams VM. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *J Reprod Immunol*. 2011; 88(2):112-7.
- Adela R, Borkar RM, Mishra N, Bhandi MM, Vishwakarma G, Varma BA, Ragampeta S, Banerjee SK. Lower Serum Vitamin D Metabolite Levels in Relation to Circulating Cytokines/Chemokines and Metabolic Hormones in Pregnant Women with Hypertensive Disorders. *Front Immunol*. 2017; 8:273.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors, critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001; 2(8):675-680.
- Alroy I, Towers TL, Freedman LP. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol*. 1995;15(10):5789-99.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. Clinical Management Guidelines for Obstetrician–Gynecologists. Acog practice bulletin number 202. Gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2019; 133(1): e1-e25.
- Aranow C. Vitamin D and the immune system. *J Invest Med*. 2011; (59):881–886.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002; 277(17):15028-34.
- Awada Z, Ossaily S, Zgheib N. The nutrigenetics and pharmacogenetics of vitamin D pathways. *Curr Pharmacogenomics Personalized Med (CPPM)* 2014; 12(2):89-103
- Baca KM, Simhan NH, Platt RW, Bodnar LM. Low maternal 25-hydroxyvitamin D concentration increases the risk of severe and mild preeclampsia. *Ann Epidemiol*. 2016; 26(12) 853-857.
- Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta*. 2008; 29:S67–S72.
- Bakacak M, Serin S, Ercan O, Köstü B, Avcı F, Kılınc M, Kiran H, Kiran G. Comparison of Vitamin D levels in cases with preeclampsia, eclampsia and healthy pregnant women. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 15;8(9):16280-6.
- Beckmann I, Efraim SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. *Hypertens Pregnancy*. 2004; 23(3):319-29.
- Berg S, Engman A, Holmgren S, Lundahl T, Laurent TC. Increased plasma hyaluronan in severe pre-eclampsia and eclampsia. *Scand J Clin Lab Invest*. 2001; 61:131-7.

- Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84(1):18-28.
- Bodnar LM, Simhan HN, Catov JM, Roberts JM, Platt RW, Diesel JC, Klebanoff MA. Maternal vitamin D status and the risk of mild and severe preeclampsia. *Epidemiology*. 2014; 25(2):207-14.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11(5):309-16.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Nastasi G, Calatroni A. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80(4):480-90.
- Costa RAA, Peraçoli JP, Magalhães, CG, Bannwart-Castro CF, Martins AMVC, Peraçoli MTS. Association between renal dysfunction and angiogenic factors in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*. 2012; 3:252.
- Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, Peraçoli MT. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res*. 2013; 47: 268-275.
- Dai Y, Zhang J, Xiang J, Li Y, Wu D, Xu J. Calcitriol inhibits ROS-NLRP3-IL-1 β signaling axis via activation of Nrf2-antioxidant signaling in hyperosmotic stress stimulated human corneal epithelial cells. *Redox Biol*. 2018; 26;21:101093.
- Di Rosa M, Malaguarnera L, Nicolosi A, Sanfilippo C, Mazzarino C, Pavone P, Berretta M, Cosentino S, Cacopardo B, Pinzone MR, Nunnari G. Vitamin D3: an ever green molecule. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2013; 5:247-60.
- Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*. 2009; 10(3):241-7.
- Fuleihan G, Bouillon R, Clarke B, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels: variability, knowledge gaps, and the concept of a desirable range. *J Bone Miner Res*. 2015; 30(7):1119-33.
- Giorgi VS, Peraçoli MT, Peraçoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF-kb pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol*. 2012; 95(1-2):67-72.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; 357(3):266-81.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(7):1911-30.

- Hyppönen E, Cavadino A, Williams D, Fraser A, Vereczkey A, Fraser WD, Bánhidly F, Lawlor D, Czeizel AE. Vitamin D and pre-eclampsia: original data, systematic review and meta-analysis. *Ann NutrMetab.* 2013; 63(4):331-40.
- Khan RN, Hay DP. A clear and present danger: inflammasomes DAMPING down disorders of pregnancy. *Hum Reprod Update* 2015; 21:388-405.
- Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, Nien JK, Gomez R, Mazor M, Saito S, Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193(3 Pt 2):921-7.
- Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, Núñez G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(2):220-5.
- Liu H, Xiong J, He T, Xiao T, Li Y, Yu Y, Huang Y, Xu X, Huang Y, Zhang J, Zhang B, Zhao J. High uric acid-induced epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells via the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Am J Nephrol.* 2017; 46(4):333-342.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
- Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.* 2006; 118(2-3):268-75.
- Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, Araújo JP Jr, Peraçoli JC, de Oliveira L, Peraçoli MT. Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in pregnant women with preeclampsia. *PLoSOne.* 2015; 10(6):e0129095.
- Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstetter A, Agostini A, Capelle M, Mege JL, Bretelle F. Preeclampsia: impaired inflammatory response mediated by Toll-like receptors. *J Reprod Immunol.* 2008; 78(1):80-3.
- Mohaghegh Z, Abedi P, Dilgouni T, Namvar F, Ruzafza S. The relation of preeclampsia and serum level of 25-hydroxyvitamin d in mothers and their neonates: a case control study in iran. *Horm Metab Res.* 2015;47(4):284-8.
- Norman AW, Bouillon R, Whiting SJ, Vieth R, Lips P. 13th Workshop consensus for vitamin D nutritional guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103:204–5.
- Noyola-Martínez N, Díaz L, Avila E, Halhali A, Larrea F, Barrera D. Calcitriol downregulates TNF- α and IL-6 expression in cultured placental cells from preeclamptic women. *Cytokine.* 2013; 61(1):245-50.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004; 279(9):7370-7.
- Peelen E¹, Damoiseaux J, Muris AH, Knippenberg S, Smolders J, Hupperts R, Thewissen M. Increased inflammasome related gene expression profile in PBMC may facilitate T helper

- 17 cell induction in multiple sclerosis. *Mol Immunol.* 2015; 63(2):521-9.
- Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2007; 57(3):177-85.
- Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66(6):460-7.
- Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2013; 100(2):129-34.
- Pontillo A, Girardelli M, Agostinis C, Masat E, Bulla R, Crovella S. Bacterial LPS differently modulates inflammasome gene expression and IL-1 β secretion in trophoblast cells, decidual stromal cells, and decidual endothelial cells. *Reprod Sci.* 2013; 20(5):563-6.
- Purswani JM, Gala P, Dwarkanath P, Larkin HM, Kurpad A, Mehta S. The role of vitamin D in pre-eclampsia: a systematic review. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017; 17(1):231.
- Priehl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients.* 2013; 5(7):2502-21.
- Qiao JY, Song L, Zhang YL, Luan B. HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway and role of vitamin D in asthmatic mice. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2017; 19(1):95-103.
- Rahimi Z, Lotfi S, Ahmadi A, Jalilian N, Shakiba E, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z. Matrix metalloproteinase-2 C-735T and its interaction with matrix metalloproteinase-7 A-181G polymorphism are associated with the risk of preeclampsia: influence on total antioxidant capacity and blood pressure. *J Obstet Gynaecol.* 2018a; 38:327-332.
- Rahimi Z, Zangeneh M, Rezaeyan A, Shakiba E, Rahimi Z. MMP-8 C-799T and MMP-8 C+17G polymorphisms in mild and severe preeclampsia: association between MMP-8 C-799T with susceptibility to severe preeclampsia. *Clin Exp Hypertens.* 2018b; 40:175-178.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180(2Pt1):499-506.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta.* 2003; 24(suppl A):S21-S27.
- Redman, CW, Sargent, IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol.* 2004; 24:565-570.
- Ribeiro VR, Romao-Veiga M, Romagnoli GG, Matias ML, Nunes PR, Borges VTM, Peracoli JC, Peracoli MTS. Association between cytokine profile and transcription factors produced

- by T-cell subsets in early- and late-onset pre-eclampsia. *Immunology*. 2017;152(1):163-173.
- Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, Baatz JE, Johnson DD. Association of maternal vitamin D and placenta growth factor with the diagnosis of early onset severe preeclampsia. *Am J Perinatol*. 2013; 30(3):167-72.
- Romao M, Weel IC, Lifshitz SJ, Peraçoli MT, Witkin SS. Elevated hyaluronan and extracellular matrix metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*. 2014; Mar;289(3):575-9.
- Romão-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Nunes PR, M Borges VT, Peraçoli JC, Peraçoli MTS. Induction of systemic inflammation by hyaluronan and hsp70 in women with pre-eclampsia. *Cytokine*. 2018; 105:23-31.
- Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *New England J med*. 2011; 364(3):248-54.
- Saïd-Sadier N, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J*. 2012; 35(6):437-449.
- Serrano-Díaz NC, Gamboa-Delgado EM, Domínguez-Urrego CL, Vesga-Varela AL, Serrano-Gómez SE, Quintero-Lesmes DC. Vitamin D and risk of preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Biomedica*. 2018; 38 Suppl 1:43-53.
- Sheikh V, Kasapoglu P, Zamani A, Basiri Z, Tahamoli-Roudsari A, Alahgholi-Hajibehzad M. Vitamin D3 inhibits the proliferation of T helper cells, downregulate CD4+ T cell cytokines and upregulate inhibitory markers. *Hum Immunol*. 2018; 79(6):439-445.
- Skrobot A, Demkow U, Wachowska M. Immunoregulatory role of vitamin D. A review. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1108: 13-23.
- Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem*. 2004; 279:17079-84.
- Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens*. 2014; 4:97-104.
- Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J steroid biochem molec biol*. 2004; 89-90(1-5):187-93.
- Uzun H, Konukoglu D, Albayrak M, Benian A, Madazli R, Aydin S, Gelisgen R, Uludag S. Increased maternal serum and cord blood fibronectin concentrations in preeclampsia are associated with higher placental hyaluronic acid and hydroxyproline content. *Hypertens Pregnancy*. 2010; 29:153-62.

- van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97(1-2):93-101.
- Verma R, Jung JH, Kim JY. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ up-regulates TLR10 while down-regulating TLR2, 4, and 5 in human monocyte THP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 141:1-6.
- Xu L, Lee M, Jeyabalan A, Roberts JM. The relationship of hypovitaminosis D and IL-6 in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2014; 210(2):149.e1-7.
- Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Misaghi A, Hoffman HM, Gallo RL. NLRP3/Cryopyrin is necessary for interleukin-1 β (IL-1 β) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem.* 2009; 284(19): 12762–12771.
- Yao L, Shi Y, Zhao X, Hou A, Xing Y, Fu J, Xue X. Vitamin D attenuates hyperoxia-induced lung injury through downregulation of Toll-like receptor 4. *Int J Mol Med.* 2017; 39(6):1403-1408.
- Ysmaïl-Dahlouk L, Nouari W, Aribi M. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ down-modulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes. *Immunol Lett.* 2016; 179:122-130.
- Wang Q, Li H, Xie H, Fu M, Guo B, Ding Y, Li W, Yu H. 25-Hydroxyvitamin D₃ attenuates experimental periodontitis through downregulation of TLR4 and JAK1/STAT3 signaling in diabetic mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013; 135:43-50.
- Weel IC, Romão-Veiga M, Matias ML, Fioratti EG, Peraçoli JC, Borges VT, Araujo JP Jr, Peraçoli MT. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2017; 123:40-47
- Zhang H, Yang N, Wang T, Dai B, Shang Y. Vitamin D reduces inflammatory response in asthmatic mice through HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2018; 17(2):2915-2920.

CAPÍTULO V

Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

“EFEITO MODULADOR DA PROGESTERONA, VITAMINA D E SILIBININA SOBRE INFLAMASSOMAS EM MONÓCITOS DE GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPسيا”

Eu, _____, gestante, atendida no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, fui convidada a participar da pesquisa para compor a lista de pacientes com pré-eclâmpسيا. O objetivo desta pesquisa é o de entender como a pré-eclâmpسيا atua no organismo das gestantes. Fui solicitada a doar pequena quantidade de sangue da veia do braço (10 mL), que será colhido com seringa e agulha descartável, uma única vez, no momento em que for atendida pelo médico. O convite para participar da pesquisa será feito na ausência de dor ou de qualquer sintoma que dificulte meu entendimento. Estou ciente de que a doação desse volume de sangue não me causará dor, a não ser a da picada da agulha no momento da coleta do sangue e, raramente, a formação de um pequeno hematoma no local. Fui informada que não terei benefícios direto com a pesquisa, mas que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo. Fui informada também que eu posso, a qualquer momento, esclarecer dúvidas e desistir de participar da pesquisa, sem prejuízo do atendimento médico que necessitar e, que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados. Estou ciente de que, caso eu seja menor de idade, este termo de consentimento deverá ser assinado por mim e pelo meu responsável.

Assim, concordo em participar da pesquisa.

Obs: Você receberá uma cópia deste documento. Informações adicionais poderão ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608 / 1609.

Botucatu, ___ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário maior de 18 anos

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

Assinatura da adolescente maior de 11 anos

Pesquisadores:

Maria Terezinha S. Peraçoli – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Fone: (14)3880-0430

Mariana Leticia Matias – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Fone: (14)3880-0431

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

“EFEITO MODULADOR DA PROGESTERONA, VITAMINA D E SILIBININA SOBRE INFLAMASSOMAS EM MONÓCITOS DE GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPSIA”

Eu, _____, gestante, atendida no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP fui convidada a participar da pesquisa para compor a lista de pacientes como grupo controle, por não possuir doença. O objetivo desta pesquisa é o de entender como a pré-eclâmpsia atua no organismo das gestantes, para isso é necessário entender como se desenvolve a gestação sem essa doença. Fui solicitada a doar pequena quantidade de sangue da veia do braço (10 mL), que será colhido com seringa e agulha descartável, uma única vez, no momento em que for atendida pelo médico. O convite para participar da pesquisa será feito na ausência de dor ou de qualquer sintoma que dificulte meu entendimento. Estou ciente de que a doação desse volume de sangue não me causará dor, a não ser a da picada da agulha no momento da coleta do sangue e, raramente, a formação de um pequeno hematoma no local. Fui informada que não terei benefícios direto com a pesquisa, mas que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo. Fui informada também que eu posso, a qualquer momento, esclarecer dúvidas e desistir de participar da pesquisa, sem prejuízo do atendimento médico que necessitar e, que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados. Estou ciente de que, caso eu seja menor de idade, este termo de consentimento deverá ser assinado por mim e pelo meu responsável.

Assim, concordo em participar da pesquisa.

Obs: Você receberá uma cópia deste documento. Informações adicionais poderão ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608 / 1609.

Botucatu, ___ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário maior de 18 anos

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

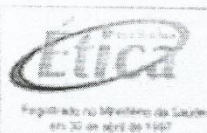
Assinatura da adolescente maior de 11 anos

Pesquisadores:

Maria Terezinha Serrão Peraçoli – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP
Fone: (14)3880-0430

Mariana Leticia Matias- Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP
Fone: (14)3880-0431

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNESP -FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito modulador da progesterona, vitamina D e silibinina sobre inflamações em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Pesquisador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 56533616.4.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.622.546

Apresentação do Projeto:

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez, caracterizada por hipertensão arterial e proteinúria, identificadas após a 20ª semana de gestação. Essa patologia está associada com hiperuricemia, valores séricos elevados de citocinas inflamatórias, ativação de leucócitos e estresse oxidativo. Cristais de ácido úrico e hialurona (HA), considerados "sinais de perigo" ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) podem ativar um complexo intracelular denominado inflamassoma, uma estrutura multi-proteica importante para o processamento e liberação das citocinas inflamatórias interleucina-1 beta (IL-1) e IL-18. O desbalanço entre citocinas pró- e anti-inflamatórias na PE poderia ser dependente da deficiência de fatores reguladores capazes de modular essa resposta inflamatória. Esse desbalanço poderia ser melhorado através da administração de flavonoides com propriedades anti-inflamatórias como a silibinina e de substâncias moduladoras da inflamação, como vitamina D e progesterona. O objetivo do trabalho é avaliar, in vitro, o efeito modulador da progesterona, vitamina D e silibinina sobre os inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU



Continuação do Parecer: 1.622.546

monócitos de gestantes portadoras de PE e em linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar o efeito modulador de progesterona, vitamina D e silibinina sobre os inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em monócitos de gestantes portadoras de PE e em linhagem celular de monócitos humanos THP-1.

Objetivo Secundário:

- Determinar os níveis plasmáticos de ácido úrico, progesterona e vitamina D em gestantes pré-eclâmpticas e em gestantes normotensas.

- Identificar a presença dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e a via de ativação TLR4-MyD88-NF- κ B, induzidos por MSU e hialurona em monócitos de gestantes portadoras de PE e em células THP-1. - Avaliar o efeito modulador da progesterona, vitamina D e silibinina sobre monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e células THP-1, estimulados ou não com MSU e hialurona e sua associação com a produção das citocinas IL-1, IL-18, TNF- α e IL-10 e inflamassomas NLRP1 e NLRP3.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: No momento da coleta de sangue pode haver dor da picada de agulha e, raramente, formação de um pequeno hematoma no local.

Benefícios: Os resultados do presente projeto contribuirão para melhor conhecimento dos mecanismos imunes envolvidos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e poderão, no futuro estabelecer estratégias diferentes de prevenção e tratamento dessa patologia obstétrica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo poderá contribuir para melhor compreensão dos mecanismos da imunidade inata envolvidos na resposta inflamatória sistêmica, descrita na pré-eclâmpsia.

Metodologia de Análise de Dados:

Monócitos obtidos do sangue periférico de 20 gestantes com PE, 20 gestantes normotensas e células THP-1 serão cultivados na presença ou ausência de urato monossódico (MSU), HA, progesterona, vitamina D ou silibinina por diferentes períodos: a) por 30 min para determinação

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

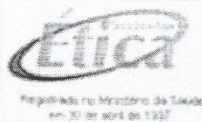
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



UNESP -FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU



Continuação do Parecer: 1.622.546

da fosforilação de NF-B e análise da expressão de TLR4, NF-B e IB por meio da técnica de citometria de fluxo, b) por 4h para a expressão gênica de TLR4, MYD88, NFKB1, NLRP1, NLRP3, CASP1, IL1B, IL18, TNF e IL10 em estudo por RT-qPCR e c) por 18h para a determinação da concentração de citocinas por ELISA. Adicionalmente, o cultivo de células THP-1, estimuladas ou não com MSU, HA, progesterona, vitamina D e silibinina por 18h serão utilizadas para avaliação das proteínas NLRP1, NLRP3 e caspase-1 pela técnica de Western Blot. Os resultados serão analisados por meio de testes não-paramétricos com nível de significância de 5%.

Participantes da Pesquisa: 40

20 Gestantes normotensas

20 gestantes pré-eclâmpticas.

Orçamento: R\$146,180,00 (bolsa doutorado).

Tempo de execução: Agosto de 2016 a Dezembro 2018.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto;

Anuência Institucional;

Autorização do departamento de Microbiologia e Imunologia

TCLE para gestantes normotensas e para gestantes pré-eclâmpticas.

Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não apresenta

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião ORDINÁRIA do CEP de 04/07/2016, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado para análise o "Relatório Final de Atividades", o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

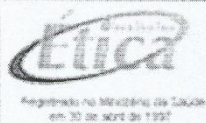
UF: SP

Município: BOTUCATU

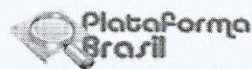
CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU



Continuação do Parecer: 1.622.546

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_710186.pdf	30/05/2016 15:00:39		Aceito
Outros	Anuencia.pdf	30/05/2016 14:59:49	Maria Terezinha Serrão Peraçoli	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	04/05/2016 10:36:50	Maria Terezinha Serrão Peraçoli	Aceito
Outros	Autorizacao_microeimuno.jpg	04/05/2016 10:02:24	Maria Terezinha Serrão Peraçoli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	04/05/2016 09:47:49	Maria Terezinha Serrão Peraçoli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Consentimento_Gestante_normotensa.docx	04/05/2016 09:46:06	Maria Terezinha Serrão Peraçoli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Consentimento_Gestante_Portadora_PE.docx	04/05/2016 09:45:23	Maria Terezinha Serrão Peraçoli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 05 de Julho de 2016

Assinado por:

SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Comprovante de Encaminhamento para Publicação



Mariana Matias <mariana.l.matias@gmail.com>

Re: [Molecules] Manuscript ID: molecules-421794 - Article Processing Charge Confirmation

1 mensagem

Ms. Jayne Song/MDPI <jayne.song@mdpi.com>
Responder a: jayne.song@mdpi.com

24 de dezembro de 2018 01:35

Para: Maria Terezinha Peracoli <terezinha.peracoli@unesp.br>
Cc: Mariana Leticia Matias <mariana.l.matias@gmail.com>, Virginia Juliani Gomes <vi.juliani@hotmail.com>, Mariana Romao-Veiga <maromao14@gmail.com>, Vanessa Rocha Ribeiro <va.rocharibeiro@gmail.com>, Priscila Rezeck Nunes <priscilarezeck@gmail.com>, Mariane Font Fernandes <marianefontfernandes@hotmail.com>, José Carlos Peracoli <jperacoli@uol.com.br>, Molecules Editorial Office <molecules@mdpi.com>

Dear Professor Peracoli,

Thank you very much for your submission. We need to confirm Article Processing Charge with you. If accepted for publication, 1800 CHF will apply to your article. Please let me know your answer, so we can continue process your manuscript. If you have any question, please feel free to let me know.

We look forward to hearing from you.

Best regards,
Jayne Song
Assistant Editor

Newly Released Impact Factor for /Molecules/ (2017): 3.098

Ms. Jayne Song
MDPI
Room 2207, Jincheng Center
Tongzhou District, Beijing 101121, China
Skype: live:581921a7a3628980
www.mdpi.com

Molecules Medicinal Chemistry Symposium 2019: Facing Novel Challenges in Drug Discovery, 15-17 May 2019, Barcelona, Spain
<https://mmcs2019.sciforum.net/>

Disclaimer: The information and files contained in this message are confidential and intended solely for the use of the individual or entity to whom they are addressed. If you have received this message in error, please notify me and delete this message from your system. You may not copy this message in its entirety or in part, or disclose its contents to anyone.

On 2018/12/21 12:09, Jayne Song wrote:
Dear Professor Peracoli,

Thank you very much for submitting your manuscript to Molecules:

Journal name: Molecules Manuscript ID: molecules-421794 Type of manuscript: Article Title: Silibinin downregulates the NF- κ B pathway and NLRP1/NLRP3 inflammasomes in monocytes from pregnant women with preeclampsia Authors: Mariana Leticia Matias, Virginia Juliani Gomes, Mariana Romao-Veiga, Vanessa Rocha Ribeiro, Priscila Rezeck Nunes, Mariane Font Fernandes, José Carlos Peracoli, Maria Terezinha Peracoli * Received: 20 December 2018 E-mails: mariana.l.matias@gmail.com, vi.juliani@hotmail.com, maromao14@gmail.com, va.rocharibeiro@gmail.com, priscilarezeck@gmail.com, marianefontfernandes@hotmail.com, jperacoli@uol.com.br, terezinha.peracoli@unesp.br Submitted to section: Natural Products Chemistry,

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=dfe50fa228&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1620433030997782607&simpl=msg-f%3A16207026...> 1/2

Silymarin and Derivatives: From Biosynthesis to Health Benefits
http://www.mdpi.com/journal/molecules/special_issues/Sylimarin

We confirm that, if accepted for publication, the following Article Processing Charges (APC) will apply to your article:

Journal APC: 1800 CHF Total APC: 1800 CHF

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code or if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see <http://www.mdpi.com/about/ioap>.

Please note that reviewer vouchers must be applied before acceptance for publication. Vouchers can no longer be applied once an APC invoice has been issued. If you have been granted any discounts that are not displayed here, please contact the Molecules editorial office as soon as possible.

Please confirm that you support open access publishing, which allows unlimited access to your published paper and that you will pay the Article Processing Charge if your manuscript is accepted.

Thank you in advance for your cooperation. I look forward to hearing from you.

Kind regards, Jayne Song Assistant Editor

Newly Released Impact Factor for /Molecules/ (2017): 3.098 -- Ms. Jayne Song MDPI Room 2207, Jincheng Center Tongzhou District, Beijing 101121, China Skype: live:581921a7a3628980 www.mdpi.com

Molecules Medicinal Chemistry Symposium 2019: Facing Novel Challenges in Drug Discovery, 15-17 May 2019, Barcelona, Spain
<https://mmcs2019.sciforum.net/>

Disclaimer: The information and files contained in this message are confidential and intended solely for the use of the individual or entity to whom they are addressed. If you have received this message in error, please notify me and delete this message from your system. You may not copy this message in its entirety or in part, or disclose its contents to anyone.