



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

**Amanda Carreira Devides**

**ENVOLVIMENTO DE HAPTOGLOBINA, HMGB1 E  
RECEPTOR CD163 DE MONÓCITOS NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA SISTÊMICA DE GESTANTES  
PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPسيا**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Mestra em Tocoginecologia.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Peraçoli  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli

**Botucatu  
2020**

Amanda Carreira Devides

ENVOLVIMENTO DE HAPTOGLOBINA, HMGB1 E  
RECEPTOR CD163 DE MONÓCITOS NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA SISTÊMICA DE GESTANTES  
PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPسيا

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestra em Tocoginecologia.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Peraçoli  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Botucatu  
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Devides, Amanda Carreira.

Envolvimento de haptoglobina, HMGB1 e receptor CD163 de monócitos na resposta inflamatória sistêmica de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Amanda Carreira Devides. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: José Carlos Peraçoli  
Coorientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli  
Capes: 21104000

1. Haptoglobinas. 2. Gestantes. 3. Pré-eclâmpsia.  
4. Monócitos.

Palavras-chave: CD163; HMGB1; Haptoglobina; Monócitos; Pré-eclâmpsia.

*Trabalho realizado no laboratório Imunologia da Reprodução do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu– UNESP com auxílio de bolsa CAPES (03/2018 a 02/2020).*



# *Dedicatória*

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

*"Honra teu pai e tua mãe, a fim de que tenhas vida longa na terra que o Senhor, o teu Deus, te dá".*

*(Êxodo 20:12)*

À minha mãe Marly e ao meu pai Paulo, que mesmo terem passado por alguns momentos de tristeza e dificuldades me ensinaram a nunca perder a fé em Deus e ter alegria de viver. Minha eterna gratidão por nunca medirem esforços pela minha felicidade. Obrigada por muitas vezes se abdicarem de seus próprios sonhos para realizarem os meus. Obrigada por me ensinarem os maiores valores da vida: fé, amor, educação, respeito e honestidade. Obrigada por me proporcionarem sempre um estudo de qualidade. Vocês são os meus exemplos de vida e as razões pelas quais cheguei até aqui. Sem vocês nada seria possível.

A vocês toda minha gratidão, admiração e amor.



# Agradecimientos

## *Agradecimento Especial*

Aos meus orientadores José Carlos Peraçoli e Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por me concederem a oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada por compartilharem seus conhecimentos e experiências e por exercerem seus papéis de educadores e orientadores com tanto amor e dedicação. Vocês são os meus exemplos de profissionais. Esta conquista também é de vocês.

A vocês minha gratidão e meu eterno carinho.

*“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção”.*

**Paulo Freire**



# Agradecimentos

À DEUS, pelo dom da minha vida, por ter me dado saúde, proteção, oportunidades e por sempre guiar e iluminar meus passos.

***“Dai graças ao Senhor porque Ele é bom. Eterna é a sua misericórdia!”.***

***Salmos 118 (117)***

Às minhas avós Genir e Encarnação, por tanto carinho, amor, cuidado e orações.

Às minhas tias, aos meus tios, primos e primas, por estarem presentes em todos os momentos de minha vida e por todos os momentos compartilhados.

Às minhas amigas e companheiras do Lab 3. Mariana Romão, Mazinha, Priscila, Vanessa e Virgínia, obrigada por me acolherem, por me ensinarem o verdadeiro significado de “trabalho em equipe” e por todos os momentos compartilhados. Com vocês esses anos se tornaram mais leves. Levarei vocês em meu coração por onde for.

À minha cachorrinha Mel, por ser o meu calmante natural nos momentos difíceis e por alegrar a minha vida.

Às minhas amigas Tatiane e Rosana, por dividirem não só a moradia comigo, mas também muitos momentos de aflição, alegria e descontração. Vocês foram presentes que ganhei em Botucatu e que levarei por toda vida.

Aos meus amigos de Bauru. Fábio, João Paulo, Larissa, Mariana e Bianca, vocês fizeram parte da melhor época da minha vida. Com vocês os cinco anos de graduação foram muito mais felizes. Amo vocês.

Às minhas orientadoras de Bauru, Ana Paula e Eliane. Obrigada por contribuírem com meu crescimento pessoal e formação profissional. Vocês são exemplos para mim.

Aos meus amigos Jessika Mayara, Jéssica, Ana Beatriz, Thiago, Otávio e Patrícia. Obrigada por estarem comigo em todos os momentos, por me acolherem nos momentos difíceis e por vibrarem comigo todas as conquistas. Amo vocês.

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

Às doutoras Graziela e Larissa, por auxiliarem na técnica de citometria de fluxo, fundamental para realização deste trabalho, e por se dedicarem na contribuição desta pesquisa.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por toda a ajuda.

Às enfermeiras do ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia, sempre prontas a ajudar.

Às gestantes que aceitaram participar desse trabalho, muito obrigada, sem vocês nada seria possível.

Ao programa de Pós-graduação em Tocoginecologia, por possibilitar a realização deste trabalho, e aos funcionários pela disposição e eficiência em todas as necessidades.

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

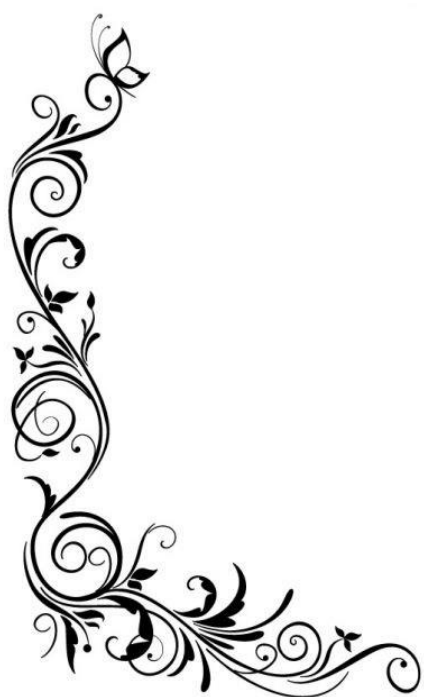
À CAPES pela concessão de bolsa durante os dois anos de mestrado.

Aos membros titulares da banca examinadora, Dr. Joelcio e Dra. Mara Sandra, assim como as suplentes Dra. Larissa e Dra. Karina, por aceitarem prontamente a avaliação deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que passaram pela minha vida e que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho, com minha evolução profissional e pessoal.

*“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos”.*

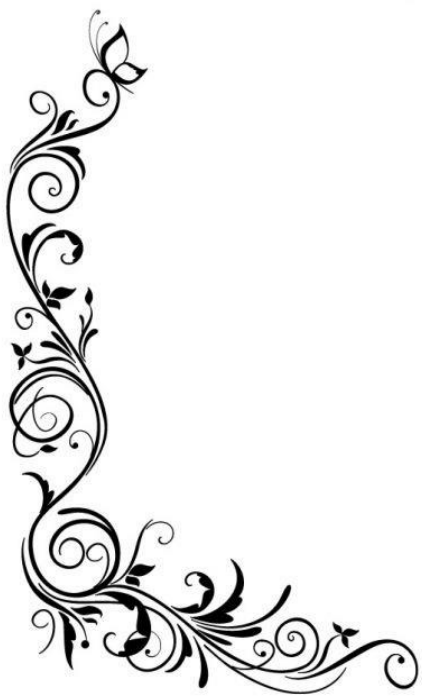
*Paulo Coelho*



# Sumário

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>20</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
<b>3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>28</b>
<b>4. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1. Casuística .....	29
4.2. Critérios de inclusão .....	29
4.3. Critérios de não inclusão .....	30
4.4. Colheita de sangue e separação do plasma .....	30
4.5. Determinação de proteinúria .....	30
4.6. Isolamento e cultura de monócitos .....	30
4.7. Análise da expressão dos receptores de superfície em monócitos .....	31
4.7.1. Estratégia de análise fenotípica dos monócitos .....	32
4.8. Determinações plasmáticas.....	32
4.9. Análise estatística .....	33
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
5.1. Características da população de estudo.....	33
5.2. Análise da expressão dos receptores de superfície de monócitos .....	34
5.3. Determinações plasmáticas.....	34
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
8.1. Anexo 1 .....	52
8.2. Anexo 2 .....	54
8.3. Anexo 3 .....	56
8.4. Anexo 4 .....	58
8.5. Anexo 5 .....	60



# Capítulo 1

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AGE:** produtos finais de glicação avançada

**APC:** fluorocromo alofococianina

**BSA:** albumina do soro bovino

**CD:** *cluster of differentiation*

**CD14:** *cluster of differentiation 14*

**CD16:** *cluster of differentiation 16*

**CD163:** *cluster of differentiation 163*

**CD206:** *cluster of differentiation 206*

**CD32:** *cluster of differentiation 32*

**CD64:** *cluster of differentiation 64*

**DAMPs:** padrões moleculares associados ao dano

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**EDTA:** ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA:** ensaio de imunoabsorção enzimática

**FcγR:** receptores opsonínicos

**FL:** fluorescência

**FSC:** *forward scatter*, parâmetro de tamanho

**°C:** graus Celsius

**GM-CSF:** fator estimulador de colônia de granulócito macrófago

**HIV:** vírus da imunodeficiência humana

**HMGB1:** *High Mobility Group Box 1*

**HO-1:** hemeoxigenase-1

**Hsp:** proteína de choque térmico

**IFN-γ:** interferon gama



**IgG:** imunoglobulina G

**IL:** interleucina

**LPS:** lipopolissacarídeo

**M1:** monócitos classicamente ativados

**M2:** monócitos alternativamente ativados

**MCP-1:** proteína quimiotática de monócitos 1

**M-CSF:** fator estimulador de colônias de macrófagos

**MIF:** média de intensidade de fluorescência

**min:** minutos

**MyD88:** fator de diferenciação mielóide 88

**NF-Kb:** *nuclear factor kappa B*

**NT:** gestantes normotensas

**PAMPs:** padrões moleculares associados a patógenos

**PBMCs:** Células mononucleares do sangue periférico

**PBS:** solução salina tamponada (*phosphate buffered saline*)

**PE:** pré-eclâmpsia

**PerCP-Cy5.5:** fluorocromo proteína piridina clorofila conjugado com corante cianina

**PRRs:** receptores de reconhecimento de padrão

**RAGE:** receptor para produtos finais de glicação avançada

**RNA<sub>m</sub>:** ácido ribonucleico mensageiro

**rpm:** rotações por minuto

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

**sCD163:** receptor CD163 solúvel

**siRAGE:** RNA de interferência para RAGE

**SSC:** *side scatter* - parâmetro de granularidade

**SW872:** cultura primária de adipócitos humanos

**TGF- $\beta$ 1:** fator transformador do crescimento beta 1

**Th1:** célula T helper 1

**Th17:** célula T helper 17

**Th2:** célula T helper 2

**TLRs:** receptores *Toll*

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa

## LISTA DE SÍMBOLOS

**g:** gramas

**mg:** miligramas

**mL:** mililitro

**mm:** milímetro

**mmHg:** milímetro de mercúrio

***p*:** nível de significância

**pg:** picograma

**U/mL:** unidade por mL

**$\mu$ g:** micrograma

**$\mu$ L:** microlitro

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema de polarização de células da linhagem monocítica/macrofágica segundo descrito por Mantovani e colaboradores (2004).....**25**
- Figura 2:** Estratégia de análise fenotípica dos monócitos por citometria de fluxo.....**32**
- Figura 3:** Expressão dos receptores de superfície TLR4 **(A)**, CD64 **(B)**, RAGE **(C)** e CD163 **(D)** em monócitos de gestantes portadoras de PE e de NT.....**34**
- Figura 4:** Concentração plasmática de haptoglobina **(A)**, HO-1 **(B)**, IL-10 **(C)** e TGF- $\beta$  **(D)** em gestantes portadoras de PE e gestantes NT.....**35**
- Figura 5:** Concentrações plasmáticas de HMGB1 **(A)**, TNF- $\alpha$  **(B)**, IL-1 $\beta$  **(C)**, IL-6 **(D)**, IL-12 **(E)** e de IL-23 **(F)** de gestantes portadoras de PE e de gestantes NT.....**35**

## RESUMO

**Introdução:** A Pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica, que se manifesta por ativação de monócitos do sangue periférico. O estado de ativação dessas células parece estar associado à produção de citocinas pró-inflamatórias bem como à sua interação com produtos endógenos celulares liberados durante lesão tecidual, denominados padrões moleculares associados a danos (DAMPs). *High mobility group Box 1* (HMGB1) é uma citocina com potente atividade inflamatória, considerada como DAMP e secretada ativamente por monócitos. Estudos recentes mostram que HMGB1 pode interagir com a proteína de fase aguda haptoglobina, formando complexos que podem ser removidos da circulação por endocitose pelo receptor CD163 presente na superfície de monócitos/macrófagos. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar o envolvimento de haptoglobina, HMGB1 e receptor CD163 na resposta inflamatória sistêmica em gestantes portadoras de PE. **Métodos:** Monócitos obtidos de gestantes pré-eclâmplicas e de gestantes normotensas (NT) foram avaliados, por citometria de fluxo, quanto à expressão dos receptores TLR4, RAGE, CD64 e CD163 para determinar o perfil M1 ou M2 apresentado por essas células. Os níveis plasmáticos de haptoglobina, HMGB1, hemeoxigenase-1 (HO-1) e de citocinas pró e anti-inflamatórias foram determinados pela técnica de ELISA. Os resultados foram analisados por testes paramétricos ou não paramétricos com nível de significância de 5%. **Resultados:** Em comparação com as gestantes NT, as gestantes pré-eclâmplicas apresentaram maior expressão dos receptores de superfície de monócitos, TLR4, CD64 e RAGE e menor expressão de CD163. Os valores plasmáticos de haptoglobina, HO-1 e IL-10 apresentaram-se significativamente diminuídos nas gestantes portadoras de PE, enquanto que as concentrações de HMGB1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TGF- $\beta$ 1 foram significativamente maiores. **Conclusão:** A expressão aumentada dos receptores TLR4, CD64 e RAGE e a concentração endógena elevada de citocinas inflamatórias demonstram que na PE os monócitos estão polarizados para o perfil inflamatório M1. Em contrapartida, a menor expressão de CD163 e os níveis diminuídos de haptoglobina, IL-10, HO-1 em monócitos dessas gestantes sugerem deficiência nos mecanismos capazes de corrigir o intenso processo inflamatório presente na PE.

**Palavras-chave:** haptoglobina, hemeoxigenase-1, HMGB1, monócitos, pré-eclâmpsia, CD163.

## ABSTRACT

**Introduction:** Preeclampsia (PE) is a pregnancy-specific syndrome characterized by a systemic inflammatory response, manifested by activation of peripheral blood monocytes. The activation state of these cells seems to be associated with the production of proinflammatory cytokines as well as their interaction with cellular endogenous products released during tissue injury, called damage-associated molecular patterns (DAMPs). High mobility group Box 1 (HMGB1) is a cytokine with potent inflammatory activity considered as DAMP and actively secreted by monocytes. Recent studies show that HMGB1 can interact with the acute phase protein haptoglobin, forming complexes that can be removed from circulation by endocytosis by the CD163 receptor on the monocyte / macrophage surface.

**Objective:** The present study aimed to evaluate the involvement of haptoglobin, HMGB1 and CD163 receptor in the systemic inflammatory response in pregnant women with PE. **Methods:** Monocytes obtained from preeclamptic and normotensive (NT) pregnant women were evaluated by flow cytometry for the expression of TLR4, RAGE, CD64 and CD163 receptors to determine the M1 or M2 profile presented by these cells. Plasma levels of haptoglobin, HMGB1, hemeoxygenase-1 (HO-1) and pro and anti-inflammatory cytokines were determined by the ELISA immunoassay. Results were analyzed by parametric or nonparametric tests with a significance level of 5%. **Results:** Compared to NT pregnant women, preeclamptic pregnant women showed higher expression of monocyte surface receptors, TLR4, CD64 and RAGE and lower expression of CD163. Haptoglobin, HO-1 and IL-10 plasma values were significantly decreased in pregnant women with PE, while HMGB1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and TGF- $\beta$ 1 concentrations were significantly increased. **Conclusion:** The increased expression of TLR4, CD64 and RAGE receptors and the high endogenous concentration of inflammatory cytokines show that monocytes from preeclamptic women are polarized to the inflammatory profile M1. In contrast, lower CD163 expression and decreased levels of haptoglobin, IL-10, HO-1 in monocytes of these pregnant women suggest deficiency in mechanisms capable of correcting the intense inflammatory process present in PE.

**Key words:** haptoglobin, hemeoxygenase-1, HMGB1, monocytes, preeclampsia, CD163.

## 1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez, que ocorre entre 2% a 10% de todas as gestações (ACOG, 2019), sendo uma das principais causas de morte materna (Magee et al., 2016). Os parâmetros clínicos que identificam essa doença são a manifestação concomitante de hipertensão arterial e proteinúria após a 20ª semana de gestação ou, na ausência de proteinúria, a ocorrência de hipertensão arterial associada a outras disfunções maternas também estão relacionadas com PE, como insuficiência renal, comprometimento hepático, complicações neurológicas ou hematológicas, disfunção útero-placentária e restrição de crescimento fetal (Tranquilli et al., 2014; Mol et al., 2016, ACOG, 2019).

A PE é caracterizada pela associação de 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). Nesse contexto, observam-se ativação de células inflamatórias como monócitos, granulócitos e células endoteliais (Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006; Medeiros et al., 2014), produção excessiva das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6; IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007; 2013; Harmon et al., 2016) e redução na concentração de citocinas reguladoras, como IL-10 (Azizieh et al., 2005; Cristofalo et al., 2013; Aggarwal et al., 2019).

Embora a fisiopatologia exata da PE seja ainda inconclusiva, acredita-se que este distúrbio imunológico tenha sua origem na placenta, resultante de lesão tecidual causada por isquemia/hipóxia e decorrente da invasão inadequada 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 $\alpha$  entre outros, que caem na circulação materna e podem interagir com leucócitos

circulantes, contribuindo para a resposta inflamatória intensa descrita na PE (Redman & Sargent, 2003).

A ativação excessiva de monócitos e granulócitos intravasculares, bem como de macrófagos, sugere que a ativação do sistema imune inato pode causar problemas na progressão da gestação (Lok et al., 2009). O significado dessas alterações imunológicas na patogênese da PE é ainda desconhecido. O estado de ativação de monócitos parece estar associado à produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres, bem como à sua interação com produtos endógenos celulares liberados durante lesão tecidual e denominados “sinais de perigo” ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs), considerados importantes moduladores da resposta inflamatória (Kim et al., 2005). As DAMPs, que são representadas por moléculas como ácido úrico (Matias et al., 2015), reativos intermediários do oxigênio, proteínas de choque térmico (Hsp70) (Asea et al., 2002; Peraçoli et al., 2013), proteínas liberadas de células mortas como HMGB1 (Park et al., 2004; Zhu et al., 2015) e produtos liberados da matriz extracelular, como fibronectina e hialurona (Saïd-Sadier & Ojcius, 2012; Romão et al., 2014; Romão-Veiga et al., 2018), podem ser responsáveis pela inflamação estéril que ocorre na PE, uma vez que essa resposta inflamatória geralmente se manifesta na ausência de infecção microbiana (Nadeau-Vallée, 2016; Brien et al., 2019).

Para exercer seus efeitos inflamatórios, as DAMPs interagem com receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos em células da imunidade inata. Esses receptores são componentes centrais do sistema imune inato e estão envolvidos na resposta inflamatória de monócitos (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Dentre esses receptores destacam-se os receptores *Toll* (TLRs), que reconhecem e ligam DAMPs (Kim et al., 2005; Kim et al., 2013) e também moléculas presentes na superfície de patógenos conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Koga & Mor, 2008). O RAGE (receptor para produtos finais de glicação avançada) é outro receptor importante, semelhante ao TLR e está normalmente expresso em baixa concentração em vários tipos celulares em estado de homeostase. No entanto, sua expressão aumenta devido a doenças e ao acúmulo de ligantes como HMGB1 (Ramasamy et al., 2009).

HMGB1 é uma proteína que foi inicialmente descrita como estritamente nuclear, devido a sua ligação ao DNA e papel na transcrição, reparação e replicação

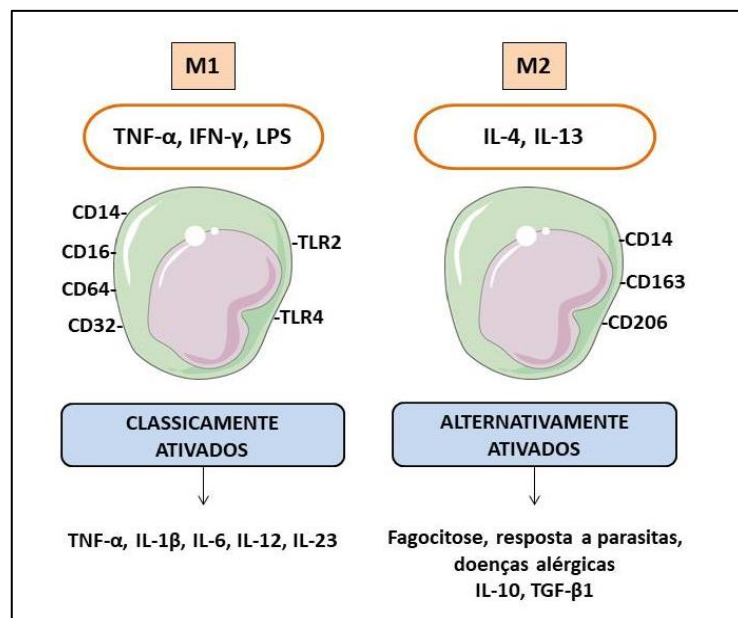
de genes (Bustin, 1999). Posteriormente, foi identificada como citocina com potente atividade inflamatória, devido a suas funções extracelulares (Lotze & Tracey, 2005; Holmlund et al., 2007). Em condições inflamatórias ou de lesão, HMGB1 é secretada ativamente por células da imunidade inata como macrófagos e monócitos (Gardella et al., 2002) e, passivamente por células necróticas, sendo considerada como “sinal de perigo” (Scaffidi et al., 2002; Wang et al., 2004; Anderson & Tracey, 2011; Yang et al., 2016). A concentração plasmática de HMGB1 encontra-se aumentada em gestantes com PE quando comparada com gestantes normotensas (Naruse et al., 2012; Zhu et al., 2015; Romão-Veiga et al., 2018), sendo considerado um mediador inflamatório, quando secretado por células imunes ativadas (Yang et al., 2013). O HMGB1 é capaz de se ligar a receptores TLR2, TLR4 e RAGE (Park et al., 2004; Xu et al., 2011; Kim et al., 2013; Tsung et al., 2014). Assim, atua sistemicamente como ativador endógeno do receptor TLR4, presente em vários tipos celulares, determinando a liberação de outras citocinas inflamatórias e do próprio HMGB1. O estímulo de monócitos humanos com HMGB1 induz ativação de NF- $\kappa$ B e liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, mas não de IL-10 ou IL-12 (Andersson et al., 2000; Andersson & Tracey, 2011).

Os dados da literatura sugerem que, a interação de monócitos de gestantes portadoras de PE com DAMPs pode ser responsável, em parte, pela ativação dessas células, resultando nas manifestações da resposta inflamatória sistêmica detectada nessa doença (Romão-Veiga et al., 2018).

Monócitos e macrófagos são células da linhagem monocítica-macrofágica, consideradas populações celulares que se adaptam e respondem a grande variedade de sinais presentes no ambiente onde se encontram (Mantovani et al., 2004). O estado de ativação e as funções dessas células são marcadamente afetados por diferentes citocinas, PAMPs e DAMPs, promovendo a orientação da resposta imune adaptativa para perfil Th1 ou Th2, bem como expressão de funções efetoras especializadas e polarizadas por essas células (Mosser, 2003; Gordon & Martinez, 2010; Martin et al., 2011; Mantovani et al., 2013; Tian et al., 2015). Assim, macrófagos podem ser classificados em pelo menos duas subpopulações com fenótipos distintos, ou seja, classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2), de acordo com suas funções (Mantovani et al., 2004; Gordon & Martinez, 2010; Jena et al., 2019).



Segundo Mantovani et al. (2004) a classificação M1 e M2 refere-se a dois extremos de um espectro de ativação de macrófagos. Assim, macrófagos são células com plasticidade porque podem mudar de um estado ativado M1 para M2 ou regulador e vice-versa, sob efeito de sinais específicos do ambiente onde se encontram (Porcheray et al., 2005; Bouhrel et al., 2007; Tarique et al., 2015). Essas células polarizadas diferem entre si pela expressão de receptores, produção de citocinas e funções efetoras. Macrófagos M1 ativados por  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  ou LPS expressam receptores opsonínicos do tipo  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ ,  $\text{RII}$  ou  $\text{RIII}$  (CD16, CD32, CD64), receptores TLR2 e TLR4 e citocinas inflamatórias  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-12}$  e  $\text{IL-23}$ , além de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (Mantovani et al., 2004; Sica et al., 2008). Por outro lado, a ativação dessas células por  $\text{IL-4}$  e  $\text{IL-13}$  polariza para o perfil M2, caracterizado por maior expressão de receptores CD163 “scavenger” para complexos haptoglobina-hemoglobina que também possui propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias (Akila et al., 2012), receptor de manose (CD206), além de maior produção de  $\text{IL-10}$  e  $\text{TGF-}\beta 1$  (Mantovani et al., 2004; Malyshev & Malyshev, 2015) (figura 1).



**Figura 1:** Esquema de polarização de células da linhagem monocítica/macrófágica segundo descrito por Mantovani e colaboradores (2004).

Essa classificação M1 e M2, inicialmente proposta para macrófagos, pode ser estendida para monócitos do sangue periférico humano em patologias como sepse (Groselj-Grenc et al., 2008), infecções (Babu et al., 2009), diabetes tipo 2 (Sato et al., 2010), doenças autoimunes e estudos utilizando agentes moduladores da

resposta inflamatória para tratamento *in vitro* dessas células (Pena et al., 2011; Awad et al., 2017). O aumento da expressão de CD64, em monócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, é considerado um marcador de atividade da doença (Kikuchi-Taura et al., 2015). Por outro lado, na leishmaniose cutânea, monócitos circulantes e macrófagos presentes nas lesões estão polarizados para o fenótipo M2, sendo que o tratamento quimioterápico restaurou o balanço M1/M2, importante para eliminar a infecção (Mukhopadhyay et al., 2015).

Em gestantes portadoras de PE demonstramos que monócitos de sangue periférico estão endogenamente ativados e polarizados para perfil M1, com aumento de receptores TLR4 e CD64, diminuição de receptores CD163 e CD206 e produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Medeiros et al., 2014). Também detectamos menor expressão do receptor CD163 em monócitos de gestantes com PE grave, associada à diminuição dos níveis plasmáticos da forma solúvel (sCD163) desse receptor e de IL-10. Paralelamente, a concentração plasmática das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi significativamente maior nessas gestantes e se correlacionou negativamente com os valores de sCD163. A associação entre o perfil de citocinas pró-inflamatórias e a menor concentração de sCD163 e IL-10 no plasma das gestantes com PE grave sugere um defeito na regulação da resposta inflamatória sistêmica observada nessa patologia (Nunes et al., 2019).

A molécula CD163 é considerada um marcador específico de monócitos/macrófagos anti-inflamatórios. A expressão do receptor CD163 aumenta por estímulo com glicocorticóides e IL-10 ou fatores de crescimento como fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), que promovem a diferenciação dos monócitos para macrófagos (Komori et al., 2012). Por outro lado, a expressão de CD163 pode ser regulada negativamente por citocinas pro-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou pela quimiocina CXCL-8 (IL-8), que diminuem a expressão de CD163 em monócitos humanos (Buechler et al., 2000). Assim, a menor expressão de CD163 em monócitos de gestantes com PE, associada à menor produção de IL-10 e à síntese elevada de TNF- $\alpha$  e IL-12 por essas células, sugerem que monócitos do sangue periférico de gestantes pré-eclâmpticas apresentam perfil inflamatório, contribuindo para a resposta inflamatória sistêmica observada nessas gestantes (Medeiros et al., 2014).

A principal função da molécula CD163, na superfície de monócitos/macrófagos é a remoção, por endocitose, de complexos de haptoglobina-hemoglobina formados na circulação, como consequência da hemólise intravascular de eritrócitos (Kristiansen et al., 2001; Weaver et al., 2006). A internalização desses complexos representa um mecanismo protetor da haptoglobina contra efeitos tóxicos da hemoglobina livre liberada sobre os tecidos, durante a hemólise, causando dano celular e estresse oxidativo (Gram et al., 2015). Assim, a haptoglobina, uma proteína de fase aguda de 100 kDa, produzida pelo fígado e secretada na circulação interage com hemoglobina extracelular decorrente de processos de hemólise, formando complexos que são removidos da circulação por meio da interação com macrófagos CD163+, presentes no fígado e na medula óssea (Schaer et al., 2006; Yang et al., 2016). Aumento de hemoglobina livre é descrita em patologias inflamatórias como sepse, infecções, hemorragias, reações transfusionais e na PE (Larsen et al., 2010; Olsson et al., 2010; Yang et al., 2016). Na PE grave, o aumento de hemoglobina livre se associou à diminuição da concentração de haptoglobina plasmática, sugerindo que o estresse oxidativo, induzido pela hemoglobina livre, pode ser um fator patogênico na PE (Olsson et al., 2010).

Recentemente, foi descrito que o receptor CD163 interage com complexos haptoglobina-HMGB1. A endocitose dos complexos haptoglobina-hemoglobina e de haptoglobina-HMGB1, após interação com o receptor CD163, induz a produção de enzimas e citocinas anti-inflamatórias, tais como hemeoxigenase-1 (HO-1) e IL-10, respectivamente (Kristiansen et al., 2001; Yang et al., 2016). Portanto, a haptoglobina parece atuar como inibidor endógeno de HMGB1 por mecanismo envolvido na via anti-inflamatória dependente de CD163 (Yang et al., 2016; 2017).

Em conjunto, os relatos da literatura sugerem que, a PE é caracterizada por resposta inflamatória exacerbada, que usualmente ocorre na ausência de infecção microbiana. Portanto, representa uma inflamação estéril associada à elevada concentração plasmática de inúmeras DAMPs como ácido úrico, Hsp70, produtos de matriz extracelular, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e HMGB1) e ativação e polarização de monócitos para perfil inflamatório M1 (Peraçoli et al., 2013; Romão et al., 2014; Medeiros et al., 2014; Matias et al., 2015; Romão-Veiga et al., 2018). Nessa doença também ocorre deficiência de mecanismos efetores antioxidantes (Cristofalo et al., 2013), menor produção de citocinas anti-inflamatórias

e concentração significativamente reduzida de inibidores endógenos como haptoglobina, hemopexina e HO-1 (Gram et al., 2015). Portanto, a análise de subpopulações de monócitos M1 e M2, bem como a determinação de citocinas e fatores anti-oxidantes como HO-1 e de haptoglobina no plasma de gestantes pré-eclâmpticas, poderão contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória sistêmica da PE.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o envolvimento de haptoglobina, HMGB1 e receptor CD163 na resposta inflamatória sistêmica em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

### **2.2. Objetivos específicos**

2.1.1 Analisar a expressão das moléculas TLR4, RAGE, CD64 e CD163 em monócitos obtidos de gestantes normotensas (NT) e de portadoras de PE, por citometria de fluxo.

2.1.2 Determinar as concentrações de haptoglobina, HMGB1, HO-1 e das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23, TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$  no plasma de gestantes normotensas e de portadoras de PE.

## **3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Monócitos de sangue periférico, obtidos de gestantes portadoras de PE e de gestantes NT foram avaliados, por citometria de fluxo, quanto à expressão das moléculas TLR4, RAGE, CD64 e CD163 para determinar o perfil M1 ou M2 apresentado por essas células. As concentrações plasmáticas de haptoglobina, HMGB1, HO-1 e das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23, TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$  foram determinadas pela técnica de ELISA.

## 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1. Casuística

Foram incluídas no estudo 20 gestantes portadoras de PE que realizaram a assistência ao parto na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e confirmada por exame ultrassonográfico precoce (< 20 semanas de gestação). Como controle, foram estudadas 20 gestantes NT pareadas por idade gestacional com as gestantes hipertensas e que não apresentaram outras comorbidades.

No presente estudo, uma gestante foi considerada portadora de PE quando, sem antecedente anterior, manifestou hipertensão arterial ( $\geq 140 \times 90$  mmHg) associada à proteinúria ( $\geq 300$  mg e  $< 2$  g em urina coletada durante 24 horas), após a 20ª semana de gestação, ou mulheres que, na ausência de proteinúria, apresentaram qualquer uma das seguintes manifestações clínicas graves: valor de pressão arterial sistólica maior ou igual a 160 mmHg e pressão arterial diastólica maior ou igual a 110 mmHg, insuficiência renal, comprometimento hepático, alterações neurológicas ou hematológicas e edema pulmonar. (Tranquilli et al., 2014; ACOG, 2019).

O tamanho amostral foi calculado, considerando-se a diferença de médias entre IL-1 $\beta$  para gestantes portadoras de PE, 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 $\beta$ , o tamanho amostral foi de, no mínimo 20 gestantes em cada 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 (Parecer: 2.809.575).

### 4.2. Critérios de inclusão

**Gestantes com PE:** mulheres com gestação única, idade gestacional entre 24 e 40 semanas e diagnóstico de PE.

**Gestantes normotensas:** mulheres com gestação única, com idade gestacional entre 24 e 40 semanas, sem diagnóstico de PE ou outras comorbidades obstétricas ou clínicas.

#### **4.3. Critérios de não inclusão**

Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de PE, tais como: gestação gemelar, hipertensão arterial crônica, diabetes, doenças renais, doenças infecciosas, doenças autoimunes, má-formação fetal, soro positividade para HIV e uso de drogas ilícitas e álcool.

#### **4.4. Colheita de sangue e separação do plasma**

Amostras de sangue (10 ml) foram colhidas, por punção venosa, em tubo estéril contendo 10U/ml de EDTA (BD Vacutainer, Franklin Lakes, EUA). No grupo de gestantes com PE a colheita foi realizada no momento do diagnóstico da doença e no grupo controle, no momento em que foram pareadas pela idade gestacional com as gestantes pré-eclâmpticas. O sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 10 min, sendo o plasma obtido armazenado a -80°C até o momento das dosagens de haptoglobina, HMGB1, HO-1 e das citocinas.

#### **4.5. Determinação 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.

#### **4.6. 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 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 1500 rpm. Após esses procedimentos, as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI para posterior contagem, utilizando-se o corante Turk 5% (1:1). Após contagem, a concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^7$  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.

Após separação, os monócitos obtidos foram contados com solução de Turk 5% (1:1) e a concentração celular foi acertada para análise da expressão dos receptores de superfície em monócitos pela técnica de citometria de fluxo.

#### **4.7. Análise da expressão dos receptores de superfície em monócitos**

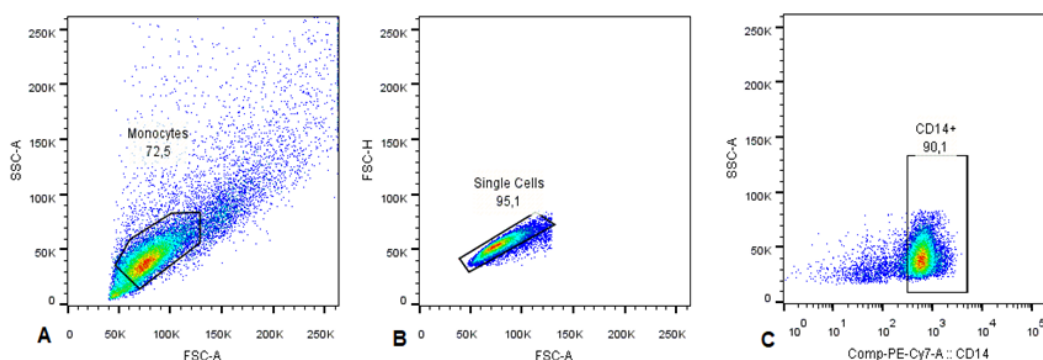
A expressão dos receptores de superfície TLR4, CD64, CD163, CD14 e RAGE foi avaliada após o cultivo dos monócitos de gestantes com PE e normotensas, obtidos conforme descrito no item 4.6. A concentração celular foi ajustada para  $2 \times 10^5$  monócitos/ml, que foram distribuídas em tubos Falcon para citômetro (BD Biosciences). As células foram incubadas com anticorpos BD Biosciences, com os respectivos fluorocromos: anti-CD14 (*allophycocyanin* - APC), anti-TLR4 (*phycoerythrin*), anti-CD64 (*phycoerythrin*) e anti-CD163 (*peridininchlorophyll protein* – PerCP-Cy5.5) por 20 min, no escuro, à 4°C. O receptor de superfície RAGE não possui anticorpo de detecção conjugado a um fluorocromo para a realização da citometria. Para sua determinação, foi necessário o uso de um anticorpo primário anti-RAGE (Abcam) e um anticorpo secundário conjugado com fluorocromo *Alexa Fluor 488* (Abcam).

Após a marcação, as células foram lavadas duas vezes com PBS/BSA e centrifugadas novamente por 5 min a 1500rpm. Para cada teste, tubos controles foram incubados com anticorpos isotípicos específicos para cada fluorocromo (APC, *phycoerythrin*, PerCP-Cy 5.5 e *Alexa Fluor 488*). A aquisição de dados foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto™II (BD Biosciences) com software FACSDiva (BD Biosciences). Foram adquiridos 30.000 eventos por amostra. Visando aperfeiçoar a população de interesse, foram estabelecidos *gates* com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e posteriormente fluorescência (FL) de CD14. A partir desse *gate*, estabelecido nos monócitos positivos para CD14, a média de

intensidade de fluorescência (MIF) de TLR4, CD64, CD163 e RAGE foi avaliada. Os resultados foram analisados no software FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.).

#### 4.7.1. Estratégia de análise fenotípica dos monócitos

Para uma análise mais refinada do fenótipo dos monócitos, delineamos estratégia de *gate* demonstrada na Figura 2. Inicialmente selecionamos a população de monócitos baseados nos padrões de FSC x SSC (tamanho e granulosidade, respectivamente) esperado para a população monocítica (figura 2A). Em seguida selecionamos a população de *Single cells* (figura 2B), a fim de excluir células agregadas e depois fizemos as demais análises dentro da população CD14+ (figura 2C).



**Figura 2.** Estratégia de análise fenotípica dos monócitos por citometria de fluxo. **(A)** O *gate* monócitos foi baseado no tamanho e granulosidade da população de interesse. **(B)** O *gate* *singlets* foi baseado na análise de células únicas. **(C)** Dentro desse último, foi criado novo *gate* de acordo com a positividade para o marcador CD14, no qual os receptores de superfície dos monócitos foram analisados.

#### 4.8. Determinações plasmáticas

Para quantificação da haptoglobina, HMGB1 e HO-1 e das citocinas IL-10, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70 e IL-23 no plasma de gestantes portadoras de PE e NT foram empregados ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando-se kits comerciais (R&D Systems). As reações foram desenvolvidas segundo as instruções do fabricante. Limite de sensibilidade dos kits: 0,529 ng/ml-haptoglobina, 0,1 ng/ml-HMGB1, 3,9 pg/ml-IL-10, 3,9 pg/ml-IL-1 $\beta$ , 15,4 pg/ml-TGF- $\beta$ 1, 15,6 pg/ml-TNF- $\alpha$ , 0,7 pg/ml-IL-6, 5,0 pg/ml-IL-12p70 e 6,8 pg/ml-IL-23.



#### 4.9. Análise estatística

Os resultados foram avaliados empregando-se testes paramétricos e não paramétricos, segundo o programa estatístico PRISM (Graph Pad, San Diego, CA, USA). As características das gestantes pré-eclâmpticas e das normotensas foram analisadas pelo teste não paramétrico *U* de *Mann-Whitney*. Para a análise da expressão dos receptores de superfície dos monócitos e das determinações plasmáticas utilizou-se o teste *t* de *Student*. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. Características da população de estudo

A análise das características das gestantes estudadas mostrou não haver diferença estatística entre os grupos de gestantes pré-eclâmpticas e normotensas com relação aos parâmetros de idade e idade gestacional. No entanto, os valores de pressão arterial sistólica e diastólica, bem como concentrações de proteinúria, apresentaram-se significativamente elevadas no grupo de gestantes portadoras de PE em relação às gestantes NT (tabela 1).

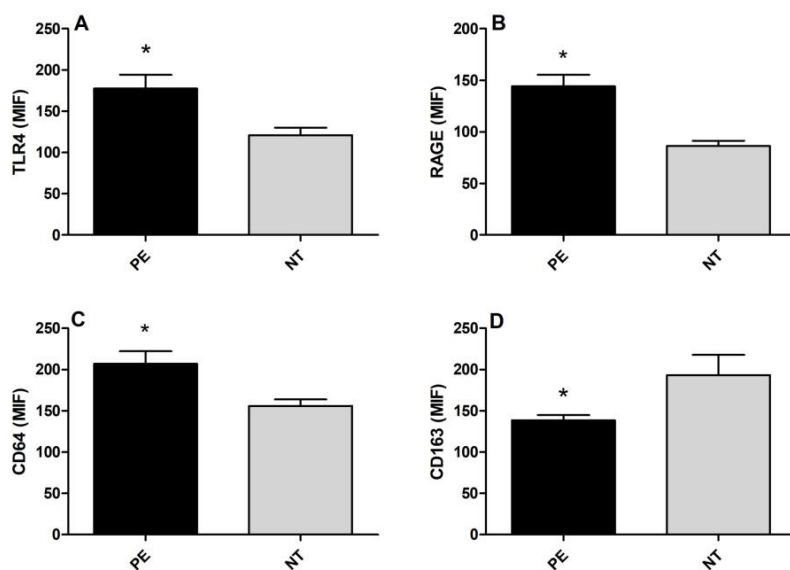
**Tabela 1.** Características de gestantes pré-eclâmpticas e de normotensas

Parâmetros	Pré-eclâmpsia n= 20	Normotensas n=20
Idade (anos)	28 (15-40)	28 (18-39)
Idade gestacional (semanas)	36 (28-39)	34 (28-40)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	150 (140-180)*	100 (90-110)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	100 (90-110)*	65 (60-70)
Proteinúria	1660 (320-8900)*	<300

Resultados expressos em mediana (valores mínimo e máximo entre parênteses). \* $p < 0,05$  vs. NT (Teste *U* de *Mann-Whitney*).

## 5.2. Análise da expressão dos receptores de superfície de monócitos

A figura 3 mostra a expressão dos receptores de superfície dos monócitos, representada pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Observa-se no grupo de gestantes com PE aumento significativo da expressão dos receptores TLR4 (figura 3A), RAGE (figura 3B) e CD64 (figura 3C) e diminuição significativa da expressão do receptor CD163 (figura 3D) quando comparados com gestantes normotensas (NT) correspondentes.

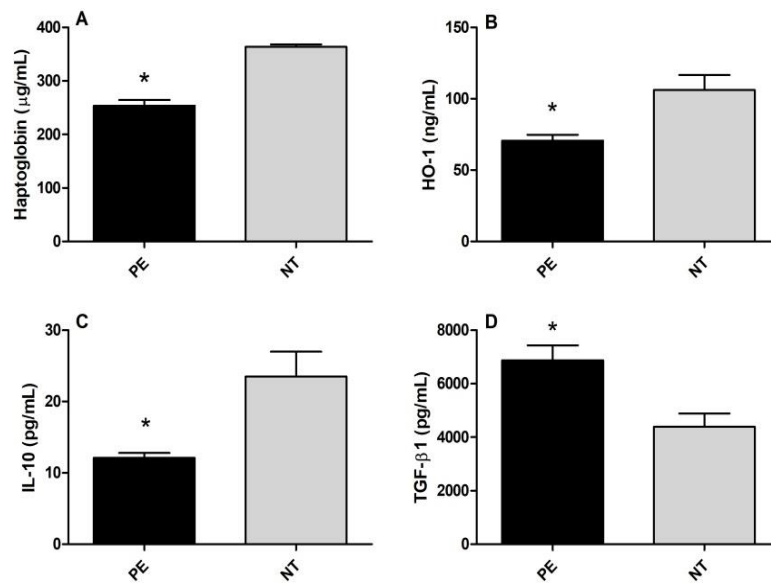


**Figura 3.** Expressão dos receptores de superfície TLR4 (A), RAGE (B), CD64 (C) e CD163 (D) em monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas (NT). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  SD da intensidade de fluorescência (MIF). \* $<0,05$  vs. NT (*teste t de Student*).

## 5.3. Determinações plasmáticas

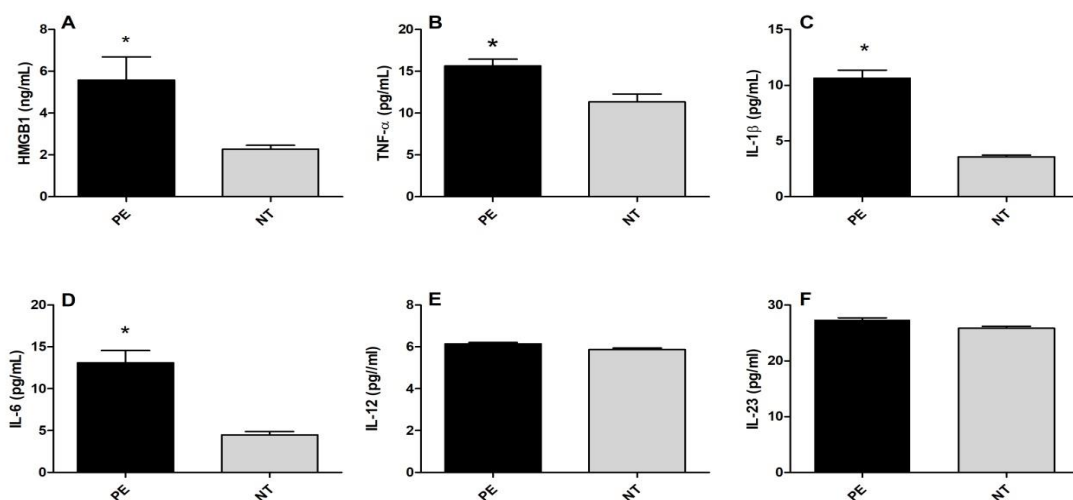
Os resultados das dosagens plasmáticas de haptoglobina, HO-1, IL-10, TGF- $\beta$ 1, HMGB1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70 e IL-23 estão representados nas figuras 4 e 5.

As concentrações plasmáticas de haptoglobina (figura 4A), HO-1 (figura 4B) e da citocina anti-inflamatória IL-10 (figura 4C) apresentaram-se significativamente menores em gestantes portadoras de PE em relação ao grupo de gestantes NT. No entanto, os níveis de TGF- $\beta$ 1 (figura 4D) foram significativamente maiores no grupo PE quando comparados ao grupo de gestantes NT.



**Figura 4.** Concentração plasmática de haptoglobina **(A)**, HO-1 **(B)**, IL-10 **(C)** e TGF-β1 **(D)** em gestantes portadoras de PE e gestantes NT. Os resultados estão expressos em média ± SD. \* $<0,05$  vs. NT (teste *t* de Student).

Com relação às dosagens plasmáticas das citocinas inflamatórias HMGB1 (figura 5A), TNF-α (figura 5B), IL-1β (figura 5C) e IL-6 (figura 5D) as gestantes portadoras de PE apresentam concentrações significativamente maiores em relação ao grupo de gestantes NT. Por outro lado, as concentrações de IL-12 (figura 5E) e IL-23 (figura 5F) foram semelhantes nos dois grupos de gestantes estudadas.



**Figura 5.** Concentrações plasmáticas de HMGB1 **(A)**, TNF-α **(B)**, IL-1β **(C)**, IL-6 **(D)**, IL-12 **(E)** e de IL-23 **(F)** de gestantes portadoras de PE e de gestantes NT. Os resultados estão expressos em média ± SD. \*  $p < 0,05$  vs. NT (teste *t* de Student).

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram que monócitos de gestantes portadoras de PE estão endogenamente ativados e polarizados para o perfil inflamatório M1, apresentando expressão aumentada de CD64, TLR4 e RAGE e diminuída do receptor CD163, marcador característico de monócitos com perfil anti-inflamatório M2. Encontramos ainda concentrações aumentadas das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, HMGB1 e TGF- $\beta$  e diminuídas de moléculas anti-inflamatórias IL-10 e HO-1 no plasma de gestantes portadoras de PE. Esses resultados confirmam evidências anteriores que relatam produção exacerbada de citocinas inflamatórias e o desequilíbrio entre moléculas pró e anti-inflamatórias, responsáveis pelo dano vascular e pela reação inflamatória sistêmica observada na PE (Sharma et al., 2011; Peraçoli et al., 2013; Raghupathy, 2013; Aggarwal et al., 2019).

A expressão significativamente elevada dos receptores TLR4, CD64 e RAGE na superfície de monócitos de gestantes pré-eclâmpticas demonstrada neste trabalho, sugerem que a presença das DAMPs, representadas por moléculas como HMGB1, pode criar um microambiente inflamatório e levar à polarização dessas células para o perfil M1, resultando no aumento da produção de radicais livres e de citocinas inflamatórias. Estudos anteriores mostraram que HMGB1 induz a polarização de macrófagos para o fenótipo M1 na miocardite autoimune experimental, que pode ser revertida com o tratamento com anticorpo monoclonal anti-HMGB1 (Su et al., 2016). A literatura relata em gestantes pré-eclâmpticas aumento da expressão do receptor TLR4 em monócitos do sangue periférico (Al-ofi et al., 2012; Medeiros et al., 2014; Chen et al., 2015), em neutrófilos (Xie et al., 2010), em células mononucleares do cordão umbilical (Xia et al., 2010) e na placenta (Bernardi et al., 2012), sugerindo que este receptor e sua via de sinalização contribuem para a patogênese da PE (Abrahams et al., 2005). Recentemente, demonstramos que a via TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B encontra-se endogenamente ativada em monócitos de gestantes portadoras de PE, associada à maior produção de IL-1 $\beta$ , IL-18 e TNF- $\alpha$  (Matias et al., 2019). Essa ativação parece estar relacionada à presença de concentrações elevadas de DAMPs como ácido úrico, hialurona de baixo peso molecular, HMGB1 e Hsp70 no plasma dessas gestantes (Kim et al., 2005; Naruse et al., 2012; Peraçoli et al., 2013; Matias et al., 2015; Romão-Veiga et

al., 2018) e contribuem para o desenvolvimento e manutenção da inflamação sistêmica da PE (Zhu et al., 2015; Matias et al., 2019).

CD64 é um receptor presente na membrana de granulócitos e monócitos, reconhecido pela sua alta capacidade de interagir com a porção Fc de IgG e pela participação em processos como fagocitose e liberação de citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (Gervasi et al., 2002). A expressão elevada desse receptor na superfície de monócitos tem sido relatada em complicações gestacionais como infecções maternas (Naccasha et al., 2001), parto prematuro espontâneo e em casos de rotura prematura de membrana (Gervasi et al., 2001; 2002). Além disso, a expressão elevada de CD64 em monócitos circulantes foi detectada em pacientes com dengue (Naranjo-Gómez et al., 2019) e lúpus eritematoso sistêmico (Kikuchi-Taura et al., 2015) e pode ser considerada um biomarcador para avaliação de atividade em doenças inflamatórias sistêmicas (Shimizu et al., 2018).

No presente trabalho, a comparação entre gestantes pré-eclâmpticas e normotensas mostrou expressão significativamente elevada de RAGE na superfície dos monócitos de gestantes com PE associada à alta concentração plasmática de HMGB1. O HMGB1 é uma citocina com potente atividade inflamatória e quando liberado por células necróticas é considerado um “sinal de perigo” ou DAMP (Wang et al., 2004; Holmlund et al., 2007; Anderson & Tracey, 2011; Yang et al., 2016). Nossos resultados concordam com os de diversos autores que relataram concentração endógena elevada de HMGB1 na circulação de gestantes portadoras de PE (Naruse et al., 2012; Zhu et al., 2015; Romão-Veiga et al., 2018; Li et al., 2018), sugerindo o envolvimento dessa molécula na resposta inflamatória exacerbada presente nessa síndrome. Essa citocina, em altas concentrações, atua como ligante de RAGE, induzindo aumento da sua expressão nos tecidos (Ramasamy et al., 2009). Esse receptor foi descrito em células placentárias e em tecidos vasculares de gestantes pré-eclâmpticas (Cooke et al., 2003; Chekir et al., 2006) e, uma vez ativado transmite sinais para a célula a fim de ativar a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para manutenção de um microambiente inflamatório (Lin et al., 2009). O tratamento de explantes placentários com soro de gestantes pré-eclâmpticas leva ao aumento da expressão de HMGB1 no citoplasma do sinciciotrofoblasto e da expressão de RAGE nas células endoteliais. Assim, a presença de HMGB1 em debris do trofoblasto, principalmente originados de células

necróticas, pode ser considerada um dos fatores tóxicos liberados pela placenta na PE, responsável pela disfunção endotelial (Shao et al., 2016). Akasaka et al. (2019), avaliando o mecanismo envolvido na indução de inflamação do tecido adiposo na PE demonstraram que a adição de soro de gestantes pré-eclâmplicas em cultura primária de adipócitos humanos SW872 induz a expressão de RNAm para IL-6, quimiocina CCL2, HMGB1 e RAGE. Resultados semelhantes foram obtidos com a adição de ligantes de RAGE, tais como AGE e HMGB1 aos adipócitos. O tratamento das culturas de adipócitos com RNA de interferência para RAGE (siRAGE) anulou os efeitos de AGE e HMGB1 sobre essas células. De acordo com os autores, os resultados sugerem que níveis séricos elevados de HMGB1 em gestantes pré-eclâmplicas induzem expressão aumentada de IL-6 pela via RAGE/NF- $\kappa$ B/IL-6, levando à inflamação sistêmica na PE.

Em nosso estudo, detectamos concentrações plasmáticas elevadas das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, HMGB1 e TGF- $\beta$ 1 e diminuição de IL-10 em gestantes portadores de PE. Esses resultados confirmam evidências anteriores relatando que o aumento de citocinas pró-inflamatórias e redução de IL-10 na circulação de gestantes acometidas por PE contribuem para a inflamação sistêmica característica dessa síndrome (Peraçoli et al., 2013; Chen et al., 2015; Ribeiro et al., 2017; Nunes et al., 2019). Eghbal-Fard e colaboradores (2019) demonstraram ainda níveis aumentados de IL-23 e reduzidos de IL-10 no sobrenadante de PBMC de gestantes pré-eclâmplicas, enquanto, Ma e colaboradores (2019) relataram que além da circulação materna, também houve aumento significativo de fatores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-6 e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) em placenta de gestantes acometidas por PE.

Citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão são essenciais para a manutenção de uma gestação normal, participando dos processos de invasão trofoblástica, diferenciação celular, adaptação vascular e até mesmo no trabalho de parto (Barrera et al., 2015; Yockey & Iwasaki, 2018). Em nosso estudo, as concentrações elevadas de TGF- $\beta$ 1 no plasma das gestantes pré-eclâmplicas poderiam estar associadas à ligação das DAMPs com o receptor RAGE, que após ser ativado estimula a produção de TGF- $\beta$  (Schaefer L, 2014). Além disso, pode estar associado ao aumento endógeno de IL-6 nessas gestantes e com os efeitos pró-inflamatórios exercidos pela citocina TGF- $\beta$ 1 na presença de IL-6. Resultados

similares foram obtidos em trabalho de nosso grupo, demonstrando que níveis significativamente aumentados de TGF- $\beta$ 1 em gestantes portadoras de PE se associaram com os níveis elevados de IL-6 e com a polarização de subpopulações de linfócitos T para o perfil inflamatório Th17 (Ribeiro et al., 2017).

Nosso trabalho demonstrou que os níveis plasmáticos de haptoglobina e HO-1 estão significativamente diminuídos em gestantes portadoras de PE. A haptoglobina, proteína de fase aguda produzida pelos hepatócitos, é caracterizada por sua capacidade de interagir com hemoglobina livre decorrente de processos de hemólise (Schaer et al., 2006), formando complexos que são removidos da circulação por endocitose, via receptor CD163, presente na superfície de monócitos e macrófagos (Yang et al., 2016). Assim, receptores CD163 “scavenger” foram inicialmente reconhecidos pela sua capacidade de remoção de complexos haptoglobina-hemoglobina da circulação e por suas propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias (Kristiansen et al., 2001; Weaver et al., 2006; Van Gorp et al., 2010; Akila et al., 2012). Mais tarde, foi descrito, em modelo experimental de sepse, que CD163 também pode interagir com complexos formados por haptoglobina-HMGB1, induzindo a liberação de IL-10 e HO-1 (Yang et al., 2016). Estudos prévios, avaliando os níveis endógenos de moléculas envolvidas no sistema de eliminação de hemoglobina, também relataram diminuição de haptoglobina na circulação de gestantes portadoras de PE (Olsson et al., 2010; Gram et al., 2015). Os baixos níveis plasmáticos de haptoglobina na PE podem refletir o consumo dessa proteína pela alta concentração de hemoglobina livre e HMGB1. Esse excesso de hemoglobina não removida pode sofrer reação de auto-oxidação, resultando na formação de metahemoglobina e reativos intermediários do oxigênio, responsáveis por indução de estresse oxidativo na PE (Gram et al., 2015).

HO-1 é uma enzima com efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, produzida juntamente com a citocina IL-10 durante processos de remoção de complexos (Kristiansen et al., 2001; Yang et al., 2017). Nossos resultados mostraram concentrações diminuídas de HO-1 no plasma de gestantes com PE, corroborando com relatos da literatura (Anderson et al., 2018). A deficiência de HO-1 detectada no presente estudo poderia estar relacionada com a expressão significativamente reduzida do receptor CD163 na superfície de monócitos e com os níveis endógenos diminuídos de haptoglobina e IL-10 em gestantes pré-eclâmpicas, contribuindo para

a inflamação sistêmica característica dessa patologia. Assim, a menor expressão de CD163 por monócitos, associada à menor concentração de IL-10 e HO-1 e maior concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e HMGB1 no plasma de gestantes pré-eclâmplicas indica que essas células estão endogenamente ativadas e diferenciadas para o fenótipo M1. Esses resultados confirmam evidências anteriores que relataram expressão reduzida de CD163 em monócitos de gestantes pré-eclâmplicas e níveis plasmáticos diminuídos de sua forma solúvel (sCD163) (Medeiros et al., 2014; Nunes et al., 2019). Ademais, segundo alguns autores, a expressão de CD163 é regulada negativamente por citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e positivamente por IL-10 (Buechler et al., 2000; Buechler et al., 2013).

Em conjunto, os resultados apresentados neste estudo demonstram a presença de um desequilíbrio entre moléculas pró e anti-inflamatórias na circulação de gestantes portadoras de PE. Esses achados sugerem que a presença do microambiente inflamatório, gerado pela presença preferencial das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e HMGB1, características desta patologia, leva à polarização de monócitos para o fenótipo M1 com expressão aumentada de marcadores inflamatórios TLR4, CD64 e RAGE, contribuindo com a manutenção da resposta inflamatória sistêmica na PE. Em contrapartida, a menor expressão de CD163 e os níveis diminuídos de haptoglobina, IL-10, HO-1 em monócitos dessas gestantes sugerem deficiência nos mecanismos capazes de corrigir o intenso processo inflamatório presente na PE.

Estudos futuros, avaliando o processo de endocitose de complexos haptoglobina-HMGB1 por receptores CD163 de monócitos de gestantes pré-eclâmplicas e normotensas, além da produção de IL-10 e HO-1 por essas células permitirá melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na polarização de monócitos M1 na PE e na inflamação sistêmica exacerbada dessa patologia.



## 7. 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; 175:8096-104.
- Aggarwal R, Jain AK, Mittal P, Kohli M, Jawanjal P, Rath G. Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. *J Clin Lab Anal*. 2019; 33:e22834. doi: 10.1002/jcla.22834.
- Akasaka J, Naruse K, Sado T, Uchiyama T, Makino M, Yamauchi A, Ota H, Sakuramoto-Tsuchida S, Itaya-Hironaka A, Takasawa S, Kobayashi H. Involvement of Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(21). pii: E5462. doi: 10.3390/ijms20215462.
- Akila P, Prashant V, Suma MN, Prashant SN, Chaitra TR. CD163 and its expanding functional repertoire. *Clin Chim Acta*. 2012; 413:669-74.
- Al-ofi E, Coffelt SB, Anumba DO. Monocyte subpopulations from pre-eclamptic patients are abnormally skewed and exhibit exaggerated responses to Toll-like receptor ligands. *PLoS One*. 2012; 7:e42217.
- 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: e1-e25.
- Anderson UD, Jälmy M, Faas MM, Hansson SR. The hemoglobin degradation pathway in patients with preeclampsia - Fetal hemoglobin, heme, heme oxygenase-1 and hemopexin - Potential diagnostic biomarkers? *Pregnancy Hypertens*. 2018; 14: 273-278.
- Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:139-62.
- Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokines synthesis in human monocytes. *J Exp Med*. 2000; 192:565-70.
- 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.
- Awad F, Assrawi E, Jumeau C, Geogin-Lavialle S, Cobret L, Duquesnay P, Piterboth W, Thomas L, Stankovic-Stojanovic K, Louvrier C, Giurgea I, Grateau G, Amselem S, Karabina SA. Impact of human monocyte and macrophage

- polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*. 2017; 12: e0175336.
- Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 54:30-7.
- Babu S, Kumaraswami V, Nutman TB. Alternatively activated and immunoregulatory monocytes in human filarial infections. *J Infect Dis*. 2009; 199:1827-37.
- Barrera, D., Díaz, L., Noyola-Martínez, N. & Halhali, A. Vitamin D and Inflammatory Cytokines in Healthy and Preeclamptic Pregnancies. *Nutrients* 2015; 7:6465–90.
- Bernardi FC, Felisberto F, Vuolo F, Petronilho F, Souza DR, Luciano TF, de Souza CT, Ritter C, Dal-Pizzol F. Oxidative damage, inflammation, and Toll-like receptor 4 pathway are increased in preeclamptic patients: a case-control study. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012:636419.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11:309-16.
- Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007; 6:137-43.
- Brien ME, Boufaied I, Soglio DD, Rey E, Leduc L, Girard S. Distinct inflammatory profile in preeclampsia and postpartum preeclampsia reveal unique mechanisms. *Biol Reprod*. 2019; 100:187-94.
- Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*. 2000; 67:97-103.
- Buechler C, Eisinger K, Krautbauer S. Diagnostic and prognostic potential of the macrophage specific receptor CD163 in inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2013;12:391-402.
- Bustin M. Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:5237-46.
- Chekir C, Nakatsuka M, Noguchi S, Konishi H, Kamada Y, Sasaki A, Hao L, Hiramatsu Y. Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nitrative stress. *Placenta*. 2006; 27:225-33.
- 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; 34:486-94.

- Cooke CL, Brockelsby JC, Baker PN, Davidge ST. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is elevated in women with preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy*. 2003; 22: 173-84.
- 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: 268-75.
- Eghbal-Fard S, Yousefi M, Heydarlou H, Ahmadi M, Taghavi S, Movasaghpour A, Jadidi-Niaragh F, Yousefi B, Dolati S, Hojjat-Farsangi M, Rikhtegar R, Nouri M, Aghebati-Maleki L. The imbalance of Th17/Treg axis involved in the pathogenesis of preeclampsia. *J Cell Physiol*. 2019; 234:5106-16.
- Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep*. 2002; 3:995-1001.
- Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Naccasha N, Blackwell S, Yoon BH, Maymon E, Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of maternal monocytes and granulocytes in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 185:1124-9.
- Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Naccasha N, Pacora P, Berman S, Maymon E, Kim JC, Kim YM, Yoshimatsu J, Espinoza J, Romero R. Maternal intravascular inflammation in preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2002; 11:171-5.
- Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010; 32:593-604.
- Gram M, Anderson UD, Johansson ME, Edström-Hägerwall A, Larsson I, Jälmbly M, Hansson SR, Åkerström B. The Human Endogenous Protection System against Cell-Free Hemoglobin and Heme Is Overwhelmed in Preeclampsia and Provides Potential Biomarkers and Clinical Indicators. *PLoS One*. 2015; 10:e0138111.
- Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes, *Mediators Inflamm*. 2008:202646.
- Harmon AC, Cornelius DC, Amaral LM, Faulkner JL, Cunningham MW Jr, Wallace K, LaMarca B. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 2016; 130:409-19.
- Holmlund U, Wähämaa H, Bachmayer N, Bremme K, Sverremark-Ekström E, Palmblad K. The novel inflammatory cytokine high mobility group box protein 1 (HMGB1) is expressed by human term placenta. *Immunology*. 2007; 122:430-7.

- 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; 24:181-90.
- Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 2008; 51(4):970-5.
- Jena MK, Nayak N, Chen K, Nayak NR. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019; 67:295-309.
- Kikuchi-Taura A, Yura A, Tsuji S, Ohshima S, Kitatoube A, Shimizu T, Nii T, Katayama M, Teshigawara S, Yoshimura M, Kudo-Tanaka E, Harada Y, Matsushita M, Hashimoto J, Saeki Y. Monocyte CD64 expression as a novel biomarker for the disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2015; 24:1076-80.
- Kim S, Kim SY, Pribis JP, Lotze M, Mollen KP, Shapiro R, Loughran P, Scott MJ, Billiar TR. Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. *Mol Med*. 2013; 19:88-98.
- 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.
- Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci*. 2008; 15:231-42.
- Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kodama A, Maeda H, Watanabe K, Kai H, Otagiri M, Maruyama TJ.  $\alpha(1)$ -Acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 protein pathway: possible protection against hemolysis-induced oxidative stress. *J Biol Chem*. 2012; 287:30688-700.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409:198-201.
- Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, Tokaji L, Bozza FA, Japiassú AM, Bonaparte D, Cavalcante MM, Chora A, Ferreira A, Marguti I, Cardoso S, Sepúlveda N, Smith A, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis *Sci Transl Med*. 2010; 2:51ra71.
- Li J, Huang L, Wang S, Zhang Z. Increased serum levels of high mobility group protein B1 and calprotectin in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2018; 142: 37-41.
- Lin L, Park S, Lakatta EG. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009; 14:1403-13.
- 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; 61:346-59.

- Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:331-42.
- Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol*. 2006; 118:268-75.
- Ma Y, Ye Y, Zhang J, Ruan CC, Gao PJ. Immune imbalance is associated with the development of preeclampsia. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98: e15080.
- Magee LA, von Dadelszen P, Stones W, Mathai M. Introduction. In: *The FIGO textbook of pregnancy hypertension. An evidence-based guide to monitoring, prevention and management*. The Global Library of Women's Medicine, London, 2016, xiv.
- Malyshev I, Malyshev Y. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: Intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage (switch) phenotype. *Biomed Res Inter* 2015; 2015:341308.
- Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33:1478-83.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25:677-86.
- Martin WJ1, Shaw O, Liu X, Steiger S, Harper JL. Monosodium urate monohydrate crystal-recruited noninflammatory monocytes differentiate into M1-like proinflammatory macrophages in a peritoneal murine model of gout. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:1322-32.
- 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:e0129095.
- Matias ML, Gomes VJ, Romao-Veiga M, Ribeiro VR, Nunes PR, Romagnoli GG, Peracoli JC, Peracoli MTS. Silibinin Downregulates the NF- $\kappa$ B Pathway and NLRP1/NLRP3 Inflammasomes in Monocytes from Pregnant Women with Preeclampsia. *Molecules*. 2019; 24. (8) pii: E1548. doi: 10.3390/molecules24081548.
- Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstettre A, Agostini A, Capelle M, Mege JL, Bretelle F. Preeclampsia: impaired inflammatory response mediated by Toll-like receptors. *J Reprod Immunol*. 2008; 78:80-3.
- 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; 72:5-13.

- Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Preeclampsia. *Lancet*. 2016; 387:999-1011.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73:209-12.
- Mukhopadhyay D, Mukherjee S, Roy S, Dalton JE, Kundu S, Sarkar A, Das NK, Kaye PM, Chatterjee M. M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9:e0004145.
- Naccasha N, Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Berman S, Yoon BH, Maymon E, Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Nov;185(5):1118-23.
- 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:R277-R292.
- Naranjo-Gómez JS, Castillo JA, Rojas M, Restrepo BN, Diaz FJ, Velilla PA, Castaño D. Different phenotypes of non-classical monocytes associated with systemic inflammation, endothelial alteration and hepatic compromise in patients with dengue. *Immunology*. 2019; 156:147-63.
- Naruse K, Sado T, Noguchi T, Tsunemi T, Yoshida S, Akasaka J, Koike N, Oi H, Kobayashi H. Peripheral RAGE (receptor for advanced glycation endproducts)-ligands in normal pregnancy and preeclampsia: novel markers of inflammatory response. *J Reprod Immunol*. 2012; 93:69-74.
- Nunes PR, Romão-Veiga M, Peraçoli JC, Araujo Costa RA, de Oliveira LG, Borges VTM, Peraçoli MT. Downregulation of CD163 in monocytes and its soluble form in the plasma is associated with a pro-inflammatory profile in pregnant women with preeclampsia. *Immunol Res*. 2019; 67: 194-201.
- Olsson MG, Centlow M, Rutardóttir S, Stenfors I, Larsson J, Hosseini-Maaf B, Olsson ML, Hansson SR, Akerström B. Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger alpha(1)-microglobulin in preeclampsia. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48:284-91.
- 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.
- Pena OM, Pistollic J, Raj D, Fjell CD, Hancock RE. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *J Immunol*. 2011; 186:7243-54.
- 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; 100:129-34.

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; 57:177-85.

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; 66:460-7.

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005; 142:481-9.

Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013; 22:8-19.

Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response--the evidence mounts. *J Leukoc Biol.* 2009; 86:505-12

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180:499-506.

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005; 308:1592-4.

Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta.* 2003; 24: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 preeclampsia. *Immunology.* 2017; 152: 163-173.

Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998; 16:5-15.

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; 289:575-9

Romao-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.

Saïd-Sadier N, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J.* 2012; 35:437-49.

- Satoh N, Shimatsu A, Himeno A, Sasaki Y, Yamakage H, Yamada K, Suganami T, Ogawa Y. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone, *Diabetes Care*, 2010; 33: e7.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002; 418:191-5.
- Schaer CA, Schoedon G, Imhof A, Kurrer MO, Schaer DJ. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ Res*. 2006; 99:943-50.
- Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem*. 2014; 289:35237-45.
- Shao J, Zhao M, Tong M, Wei J, Wise MR, Stone P, Chamley L, Chen Q. Increased levels of HMGB1 in trophoblastic debris may contribute to preeclampsia. *Reproduction*. 2016; 152:775-84.
- Sharma D, Singh A, Trivedi SS, Bhattacharjee J. Role of endothelin and inflammatory cytokines in pre-eclampsia - A pilot North Indian study. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 65:428-32.
- Shimizu T, Kikuchi-Taura A, Tsuji S, Matsushita M, Ohshima S, Saeki Y. Up-regulation of CD64 Expression on Monocytes in Patients With Active Adult-Onset Still Disease: A Possible Biomarker of Disease Activity. *J Clin Rheumatol*. 2018; doi: 10.1097/RHU.0000000000000931.
- Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*. 2008; 18:349-55.
- Su Z, Zhang P, Yu Y, Lu H, Liu Y, Ni P, Su X, Wang D, Liu Y, Wang J, Shen H, Xu W, Xu H. HMGB1 Facilitated Macrophage Reprogramming towards a Proinflammatory M1-like Phenotype in Experimental Autoimmune Myocarditis Development. *Sci Rep*. 2016; 6:21884.
- Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. Phenotypic, Functional, and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015; 53:676-88.
- Tian S, Zhang L, Tang J, Guo X, Dong K, Chen SY. HMGB1 exacerbates renal tubulointerstitial fibrosis through facilitating M1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015; 308:F69-75.
- 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.



- Tsung A, Tohme S, Billiar TR. High-mobility group box-1 in sterile inflammation. *J Intern Med.* 2014; 276:425-43.
- Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol.* 2010; 47:1650-60.
- Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med.* 2004; 255:320-31.
- Weaver LK, Hintz-Goldstein KA, Pioli PA, Wardwell K, Qureshi N, Vogel SN, Guyre PM. Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol.* 2006; 80:26-35.
- 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; 33:188-94.
- Xia G, Xu D, Wu M, Wu C. Expression of Toll-like receptor 4 in neonatal cord blood mononuclear cells in patients with preeclampsia. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2010; 30: 615-9.
- Xie F, Hu Y, Turvey SE, Magee LA, Brunham RM, Choi KC, Kraiden M, Leung PC, Money DM, Patrick DM, Thomas E, von Dadelszen P. Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG.* 2010; 117: 99-108.
- Xu D, Young J, Song D, Esko JD. Heparan sulfate is essential for high mobility group protein 1 (HMGB1) signaling by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem.* 2011; 286:41736-44.
- Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 2013; 93:865-73.
- Yang H, Wang H, Levine YA, Gunasekaran MK, Wang Y, Addorisio M, Zhu S, Li W, Li J, de Kleijn DP, Olofsson PS, Warren HS, He M, Al-Abed Y, Roth J, Antoine DJ, Chavan SS, Andersson U, Tracey KJ. Identification of CD163 as an antiinflammatory receptor for HMGB1-haptoglobin complexes. *JCI Insight.* 2016; 1:e85375.
- Yang H, Wang H, Wang Y, Addorisio M, Li J, Postiglione MJ, Chavan SS, Al-Abed Y, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The haptoglobin beta subunit sequesters HMGB1 toxicity in sterile and infectious inflammation. *J Intern Med.* 2017; 282:76-93.
- Yockey LJ, Iwasaki A. Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. *Immunity.* 2018; 49:397-412.

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.



*Anexos*

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo 1

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

#### RESOLUÇÃO 466/2012

#### (Participante maior de 18 anos)

CONVIDO, a senhora \_\_\_\_\_ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Envolvimento de haptoglobina, HMGB1 e receptor CD163 de monócitos na resposta inflamatória sistêmica de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia” que será desenvolvido por mim, Amanda Carreira Devides (Farmacêutica), com orientação do Médico e Professor José Carlos Peraçoli da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Estamos estudando a pré-eclâmpsia. Para que possamos ter um resultado nesse momento precisamos coletar 10 ml do seu sangue que serão utilizados para experimentos imunológicos relacionados a doença. O risco com a coleta de sangue será a picadinha da agulha e uma manchinha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

Informamos que o material biológico colhido da Senhora, não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenada na Faculdade de Medicina. Para reutilização desse material será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que para a senhora assine nova autorização para utilização desse material.

Fui informada que não terei benefícios diretos 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.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue a Senhora devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que

os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Pesquisador

---

Participante da Pesquisa

**Pesquisadores:**

Amanda Carreira Devides – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Fone: (14)3880-0431 [amandac\\_devides@hotmail.com](mailto:amandac_devides@hotmail.com)

José Carlos Peraçoli – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP

Fone: (14) 3880-1015 [peracoli@fmb.unesp.br](mailto:peracoli@fmb.unesp.br)

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

Fone: (14)3880-0430 [peracoli@ibb.unesp.br](mailto:peracoli@ibb.unesp.br)

Mariana Romão Veiga – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Fone: (14)3880-0431 [maromao14@gmail.com](mailto:maromao14@gmail.com)

## 8.2. Anexo 2

### **TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

#### **RESOLUÇÃO 466/2012**

**(Para menores entre 12 a 17 anos/11 meses e 29 dias)**

CONVIDO, você \_\_\_\_\_ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Envolvimento de haptoglobina, HMGB1 e receptor CD163 de monócitos na resposta inflamatória sistêmica de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia” que será desenvolvido por mim, Amanda Carreira Devides (Farmacêutica), com orientação do Médico e Professor José Carlos Peraçoli da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Caso concorde em participar da pesquisa você deverá assinar este Termo de Assentimento e seu Representante Legal assinará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participantes de pesquisa entre 11 a 17 anos/11/meses e 29 dias

Estamos estudando a pré-eclâmpsia. Para que possamos ter um resultado nesse momento precisamos coletar 10 ml do seu sangue, que serão utilizados para experimentos imunológicos relacionados à doença. O risco com a coleta de sangue será a picadinha da agulha e uma manchinha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

Informamos que o seu material biológico colhido não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenada na Faculdade de Medicina. Para reutilização desse material será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que para a senhora assine nova autorização para utilização desse material.

Fui informada que não terei benefícios diretos 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.

Fiquei ciente, que a participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do tratamento, ou qualquer outra atividade em que você esteja participando.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue a você devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos. Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO em participar de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardos através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados e revistas científicas.

Botucatu, \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

---

Pesquisador

---

Participante da Pesquisa

**Pesquisadores:**

Amanda Carreira Devides – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Fone: (14)3880-0431 [amandac\\_devides@hotmail.com](mailto:amandac_devides@hotmail.com)

José Carlos Peraçoli – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP

Fone: (14) 3880-1015 [peracoli@fmb.unesp.br](mailto:peracoli@fmb.unesp.br)

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

Fone: (14)3880-0430 [peracoli@ibb.unesp.br](mailto:peracoli@ibb.unesp.br)

Mariana Romão Veiga – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Fone: (14)3880-0431 [maromao14@gmail.com](mailto:maromao14@gmail.com)

OBS: Este Assentimento Livre e Esclarecido deverá vir acompanhado do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de para participantes de pesquisa de 12 anos a 17 anos/11 meses e 29 dias).

### 8.3. Anexo 3

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

#### **RESOLUÇÃO 466/2012**

**(Para Responsável Legal de participantes de 12anos a 17anos/11meses e 29 dias)**

CONVIDO, o Senhor (a) \_\_\_\_\_ responsável pelo menor \_\_\_\_\_ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado: “Envolvimento de haptoglobina, HMGB1 e receptor CD163 de monócitos na resposta inflamatória sistêmica de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia” que será desenvolvido por mim, Amanda Carreira Devides (Farmacêutica), com orientação do Médico e Professor José Carlos Peraçoli da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Estamos estudando a pré-eclâmpsia. Para que possamos ter um resultado nesse momento precisamos coletar 10 ml do sangue da sua filha \_\_\_\_\_, que serão utilizados para experimentos imunológicos relacionados a doença. O risco com a coleta de sangue será a picadinha da agulha e uma manchinha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

Informamos que o material biológico colhido de sua filha não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenada na Faculdade de Medicina. Para reutilização desse material será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que para o (a) senhor (a) assine nova autorização para utilização desse material.

Solicito também seu consentimento para consultar o prontuário médico de sua filha, para coletar outras informações lá contidas, que possam fornecer subsídios para fazer comparação entre o indivíduo saudável e em tratamento de doença.

Fui informada que minha filha não terá benefícios diretos com a pesquisa, mas que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo.

Fui informado (a) também que eu posso, a qualquer momento, esclarecer dúvidas e desistir de consentir que ela participe da pesquisa, sem prejuízo do atendimento médico que ela necessitar e, que o nome dela não aparecerá quando os resultados forem divulgados.

Informo que a participação de sua filha neste estudo é voluntária e que mesmo após o senhor ter dado o consentimento para que ele participe da pesquisa, o senhor poderá retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.



Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos. Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO na qualidade de “Representante Legal” a participação de meu (minha) filho(a) de forma voluntária, estando ciente que todos os seus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Pesquisador

---

Representante Legal pelo Participante da Pesquisa

**Pesquisadores:**

Amanda Carreira Devides – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Fone: (14)3880-0431 [amandac.devides@hotmail.com](mailto:amandac.devides@hotmail.com)

José Carlos Peraçoli – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP

Fone: (14) 3880-1015 [peracoli@fmb.unesp.br](mailto:peracoli@fmb.unesp.br)

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

Fone: (14)3880-0430 [peracoli@ibb.unesp.br](mailto:peracoli@ibb.unesp.br)

Mariana Romão Veiga – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Fone: (14)3880-0431 [maromao14@gmail.com](mailto:maromao14@gmail.com)

OBS: Esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverá vir acompanhado do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para participantes de pesquisa de 12 anos a 17 anos/11 meses e 29 dias).

#### 8.4. Anexo 4

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012 – GRUPO CONTROLE

CONVIDO, a senhora \_\_\_\_\_ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Envolvimento de haptoglobina, HMGB1 e receptor CD163 de monócitos na resposta inflamatória sistêmica de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia” que será desenvolvido por mim, Amanda Carreira Devides (Farmacêutica), com orientação do Médico e Professor José Carlos Peraçoli da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Sua participação nesta pesquisa se dará por ser uma gestante saudável, sem nenhum tipo de doença. Todos os dados que obtivermos com sua participação são meramente para compararmos com os dados de outros participantes que possuem a doença que estamos estudando.

Estamos estudando a pré-eclâmpsia. Para que possamos ter um resultado nesse momento precisamos coletar 10 ml do seu sangue ou um pedaço da placenta após o parto, que serão utilizados para experimentos imunológicos relacionados à doença. O risco com a coleta de sangue será a picadinha da agulha e uma manchinha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

Informamos que o material biológico colhido da Senhora, não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenada na Faculdade de Medicina. Para reutilização desse material será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que para a senhora assine nova autorização para utilização desse material.

Solicito também seu consentimento para levantar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas, que possam fornecer subsídios para fazer comparação entre o indivíduo saudável e em tratamento de doença.

A Senhora não terá nenhum benefício em participar desta pesquisa, pois como já explicamos seus dados serão meramente para comparar com os dados de uma pessoa em tratamento de doença.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer penalidade.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descrito:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardado através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados e revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

---

Pesquisador

---

Participante da Pesquisa

### **Pesquisadores:**

Amanda Carreira Devides – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP  
Fone: (14)3880-0431 [amandac\\_devides@hotmail.com](mailto:amandac_devides@hotmail.com)

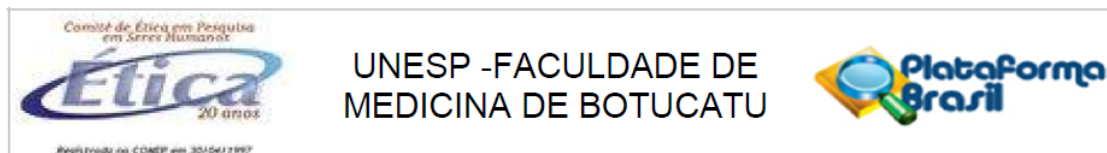
José Carlos Peraçoli – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP  
Fone: (14) 3880-1015 [peracoli@fmb.unesp.br](mailto:peracoli@fmb.unesp.br)

Maria Terezinha S. Peraçoli – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP  
Fone: (14)3880-0430 [peracoli@ibb.unesp.br](mailto:peracoli@ibb.unesp.br)

Mariana Romão Veiga – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP  
Fone: (14)3880-0431 [maromao14@gmail.com](mailto:maromao14@gmail.com)

## 8.5. Anexo 5

### PARECER DO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Envolvimento de haptoglobina, HMGB1 e receptor CD163 de monócitos na resposta inflamatória sistêmica de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

**Pesquisador:** José Carlos 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:** 94262418.0.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

**Patrocinador Principal:** FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.809.575

##### Apresentação do Projeto:

Pesquisa visando obtenção de título de mestrado - Serão estudadas 40 gestantes portadoras de PE, sendo 20 com diagnóstico de PE leve e 20 com diagnóstico de PE grave, com idade gestacional entre 24 e 40 semanas de gestação, que realizarem a assistência ao parto na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. O grupo controle será constituído por 20 gestantes normotensas, pareadas por idade gestacional com as gestantes hipertensas, e que não apresentem outras comorbidades. Coleta de sangue e armazenamento do material em Biobanco. Será colhido 10mL de sangue periférico, da população de estudo, por punção venosa, em tubo estéril contendo 10U/mL de EDTA (BD Vacutainer, Franklin Lakes, EUA). No grupo de gestantes com pré-eclâmpsia a colheita será realizada no momento do diagnóstico da doença e no grupo de gestantes normotensas, no momento em que forem pareadas pela idade gestacional com as gestantes pré-eclâmpicas. Com descrição detalhada do método de análise no estudo. Divisão de 3 grupos no estudo com 20 gestantes em cada grupo.

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

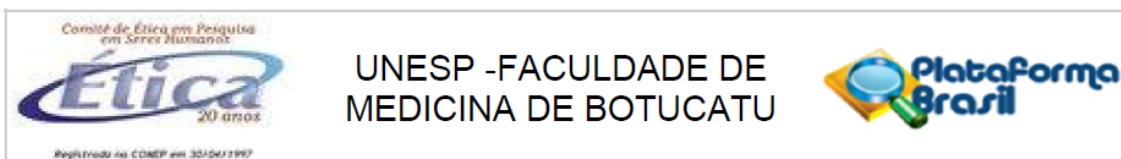
**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP **Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1609

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.809.575

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o envolvimento de haptoglobina, HMGB1 e receptor CD163 na resposta inflamatória sistêmica em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

**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 desta patologia obstétrica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa devidamente delineada e com todos os termos apresentados corretamente, incluindo autorização para BIORREPOSITÓRIO.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentados adequadamente.

**Recomendações:**

Adequar cronograma para início do estudo após a aprovação deste CEP.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto de pesquisa encontra-se APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 06 de agosto de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

<b>Endereço:</b> Chácara Butignolli , s/n	
<b>Bairro:</b> Rubião Junior	<b>CEP:</b> 18.618-970
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BOTUCATU
<b>Telefone:</b> (14)3880-1609	<b>E-mail:</b> cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.809.575

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situaçãc
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1168920.pdf	17/07/2018 10:03:29		Aceito
Outros	termo_de_anuencia_institucional.pdf	17/07/2018 10:02:57	José Carlos Peraçoli	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostoassinada.pdf	17/07/2018 10:02:37	José Carlos Peraçoli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Amanda_Mestrado.pdf	27/06/2018 10:24:52	José Carlos Peraçoli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel.docx	27/06/2018 10:23:04	José Carlos Peraçoli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maior_de_18_anos.docx	27/06/2018 10:22:58	José Carlos Peraçoli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_grupo_controle.docx	27/06/2018 10:22:52	José Carlos Peraçoli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_menores_de_18_anos.docx	27/06/2018 10:22:44	José Carlos Peraçoli	Aceito
Cronograma	Cronograma_Amanda.docx	27/06/2018 10:21:33	José Carlos Peraçoli	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio_Amanda.docx	27/06/2018 10:21:20	José Carlos Peraçoli	Aceito
Orçamento	Orcamento_Amanda.docx	27/06/2018 10:21:00	José Carlos Peraçoli	Aceito

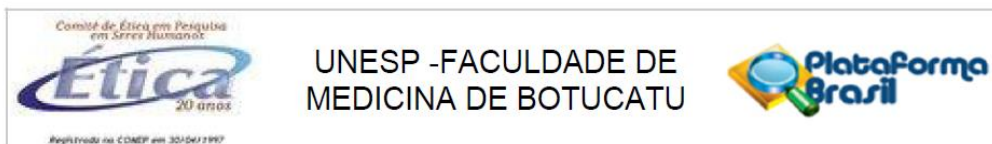
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

<p><b>Endereço:</b> Chácara Butignolli, s/n  <b>Bairro:</b> Rubião Junior  <b>UF:</b> SP      <b>Município:</b> BOTUCATU  <b>Telefone:</b> (14)3880-1609</p>	<p><b>CEP:</b> 18.618-970</p>	<p><b>E-mail:</b> cep@fmb.unesp.br</p>
--	-------------------------------	--



Continuação do Parecer: 2.809.575

BOTUCATU, 09 de Agosto de 2018

---

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)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br