

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/02/2022.



**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 Cecap, Botucatu, pela parceria, atenção e auxílio disponibilizado.

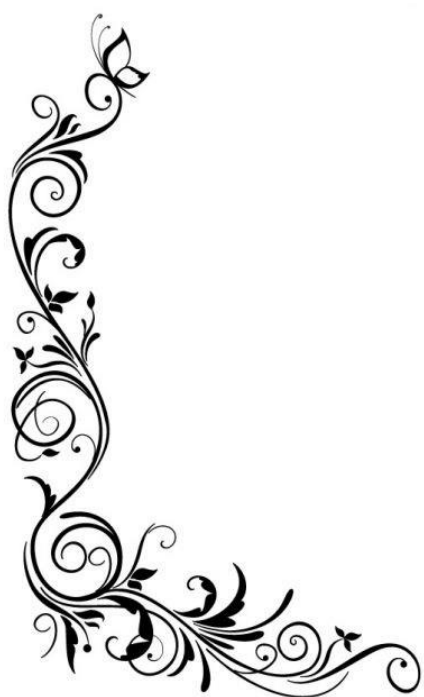
À CAPES pela concessão de bolsa durante os dois anos de mestrado.

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”.

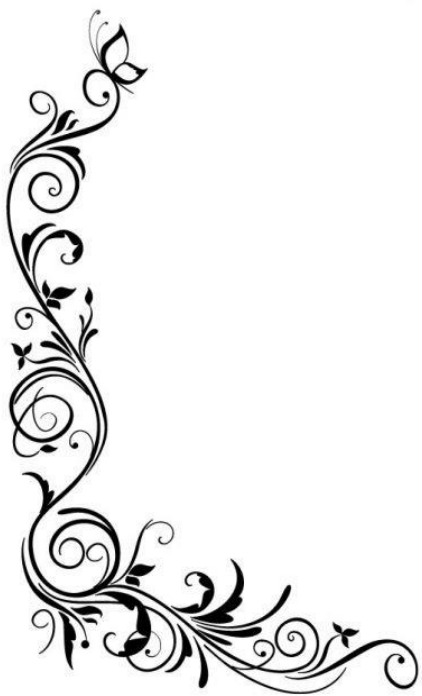
Paulo Coelho



Sumário

SUMÁRIO

RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
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
5. RESULTADOS	33
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
6. DISCUSSÃO	36
7. REFERÊNCIAS	41
8. ANEXOS.....	52
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_m: 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- β 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- α : 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

μ g: micrograma

μ 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- β **(D)** em gestantes portadoras de PE e gestantes NT.....**35**
- Figura 5:** Concentrações plasmáticas de HMGB1 **(A)**, TNF- α **(B)**, IL-1 β **(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- α , IL-1 β , IL-6 e TGF- β 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- α , IL-1 β , IL-6 and TGF- β 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 β), IL-6; IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (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 α 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- κ B e liberação de TNF- α , IL-1 β , 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 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$, RII ou RIII (CD16, CD32, CD64), receptores TLR2 e TLR4 e citocinas inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 e 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 IL-4 e 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 IL-10 e $\text{TGF-}\beta 1$ (Mantovani et al., 2004; Malyshev & Malyshev, 2015) (figura 1).

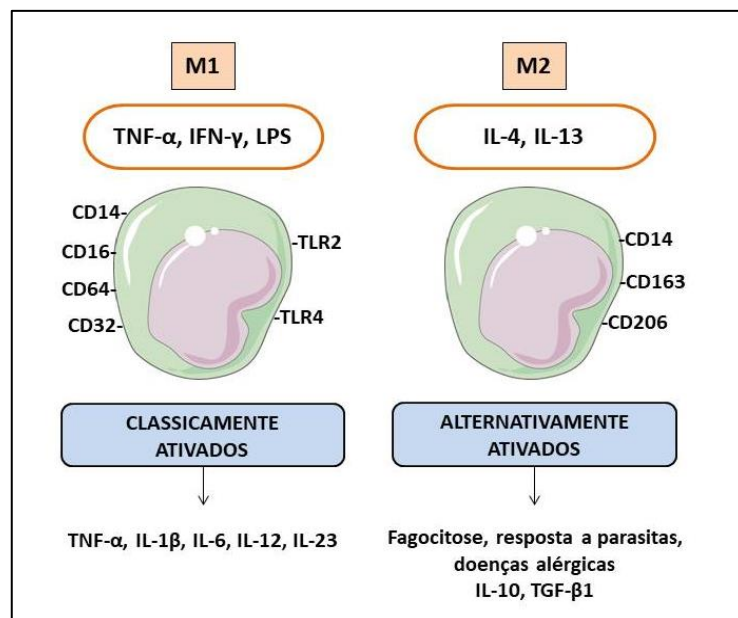


Figura 1: Esquema de polarização de células da linhagem monocítica/macrófágica segundo descrito por Mantovani e colaboradores (2004).

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 β e TNF- α 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- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-1 β 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- α 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 β , TNF- α , 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.

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, Georgin-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, Jälmy 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.
- Grošelj-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-κB 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.