

**BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES
UNESP**

RESSALVA

Alertamos para ausência de capa, folhas de rosto e anexos, não incluídos pelo autor no arquivo original.

MENSAGEM

SÓ DEUS PODE

*Só Deus pode criar,
mas você pode valorizar o que ele criou.*

*Só Deus pode dar a vida,
mas você pode transmiti-la e respeitá-la.*

*Só Deus pode dar a fé,
mas você pode dar o seu testemunho.*

*Só Deus pode dar a paz,
mas você pode semear a união.*

*Só Deus pode dar a força,
mas você pode apoiar quem desanimou.*

*Só Deus pode infundir esperança,
mas você pode restituir confiança ao irmão.*

*Só Deus pode dar o amor,
mas você pode ensinar o seu irmão a amar.*

*Só Deus pode dar alegria,
mas você pode sorrir a todos.*

*Só Deus é o caminho,
mas você pode indicá-lo aos outros.*

*Só Deus é a luz,
mas você pode fazê-la brilhar no mundo.*

*Só Deus é a vida,
mas você pode dar aos outros a alegria de viver.*

*Só Deus pode fazer o impossível,
mas você sempre poderá fazer o possível.*

*Só Deus pode fazer milagres,
mas você pode fazer sacrifícios.*

*Só Deus pode fazer a semente do bem germinar,
mas você pode plantá-la no coração humano.*

*Só Deus se basta a si mesmo,
mas ele preferiu contar com VOCÊ*

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios da Disciplina de Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, com auxílio financeiro da CAPES.

As gestantes normais, gestantes com pré-eclâmpsia e mulheres não gestantes que se dispuseram a participar deste trabalho.

COM AMOR

Ao meu marido e companheiro, Marcos, pelo amor, compreensão, paciência e apoio nos momentos de decisões, tornando muito mais fácil a minha caminhada.

Aos meus filhos Thiago e Rodrigo, maior conquista e razão de minha vida, pelos momentos em que não pude estar presente.

Aos meus pais, Jair e Sebastiana que são meus exemplos de dignidade, força e determinação me apoiando durante toda esta fase de minha vida.

À minha irmã Cristina, minha sogra Therezinha e tia Lourdes pelo incentivo e apoio durante toda esta trajetória.

COM CARINHO ESPECIAL

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, pelo incentivo, confiança, amizade e pela oportunidade de desenvolver este trabalho segura e objetivamente, contribuindo significativamente na minha vida profissional .

Ao Prof. Dr. José Carlos Peraçoli, pelo estímulo, carinho, amizade e principalmente pelo incentivo e oportunidade de trabalhar com gestantes.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, pelo companheirismo, amizade, disponibilidade e solidariedade científica.

A Dra Maria Fátima Sugizaki e Maria do Socorro P. e Cruz pelo apoio, amizade, paciência, disponibilidade e ajuda nos momentos difíceis da minha jornada.

À amiga Cilmary Suemi Kurokawa, pela disponibilidade e companheirismo, pelo imprescindível auxílio na realização das técnicas imunológicas e, principalmente, pela amizade e carinho durante todo tempo.

Em especial, às amigas Daniela R. Rodrigues, Daniela P. Almeida, Ana Cláudia Pelizon, Sandra de Moraes G. Bosco, Maria Antônia (Tó) pelo constante apoio nas fases difíceis da minha caminhada, pela confiança e pelo enorme carinho e amizade.

Aos colegas de laboratório: Sueli A. Calvi, Luciane A Dias, Márcia Guimarães da Silva, Flávia H. Barbosa, Raquel, Keila, João Paulo, Érika e Márcia Furlan, pelo convívio sempre agradável.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Dra Alexandrina Sartori, Dr José Maurício Sforcin, Dr Ramon Kaneno, Dr Silvio Luís de Oliveira, Dr. Eduardo Bagagli, agradeço pelo incentivo, amizade e atenção durante todo tempo.

Aos técnicos e auxiliares do laboratório de Imunologia, Luis, Maria Antônia, Rocha e Lourdes, pelo carinho e constante colaboração

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, funcionários da Faculdade de Medicina de Botucatu, bibliotecárias, seção de Pós Graduação da Faculdade de Medicina, pela prontidão em servir e auxiliar na parte técnica e burocrática deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de Mestrado concedida

Em especial aos meus amigos do laboratório de Imunopatologia do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu: Laura, Isabel, Claudinei, Izaira, Dra. Denise Fecchio, Luis Gastão, Marino Alves, Dr. Marcello F. Franco, Dra. Mariângela A Marques e Rita de Cássia, que desde a minha chegada aqui na faculdade, estiveram presentes e acompanhando cada passo, acreditando em mim, me dando forças para que eu não desanimasse, me apoiando e principalmente contribuindo em grande parte com o meu amadurecimento profissional.

À auxiliar de enfermagem Maria Claudete de Andrade Zanella pela coleta das amostras sanguíneas das pacientes com pré-eclâmpsia.

Aos funcionários do Depto. de Ginecologia e Obstetrícia e à secretária da Pós-Graduação, Cristiane, pela atenção e prontidão em servir na parte burocrática deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- *Box-plot* representando os níveis de TNF- α produzidos por monócitos estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS) em mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os quadrantes superior e inferior representam os percentis 75 e 25 respectivamente e, o traço horizontal a mediana de cada grupo. As barras de erro representam os percentis 90 e 10.

* ($p < 0,01$) GN, PE x MN – *Kruskal-Wallis (ANOVA)*

+ ($p < 0,05$) GN x PE – *Teste U de Mann-Whitney*..... 66

Figura 2- *Box-plot* representando os níveis de IL-10 produzidos por monócitos estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS) em mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os quadrantes superior e inferior representam os percentis 75 e 25 respectivamente e, o traço horizontal a mediana de cada grupo. As barras de erro representam os percentis 90 e 10.

* ($p < 0,01$) GN, PE x MN – *Kruskal-Wallis (ANOVA)*..... 69

Figura 3 - *Box-plot* representando os níveis de TGF- β produzidos por monócitos estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS) em mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os quadrantes superior e inferior representam os percentis 75 e 25 respectivamente e, o traço horizontal a mediana de cada grupo. As barras de erro representam os percentis 90 e 10.

* ($p < 0,01$) GN, PE x MN – *Kruskal-Wallis (ANOVA)*

+ ($p < 0,05$) GN x PE;– *Teste U de Mann-Whitney*; MN x GN - *Kruskal-Wallis*..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas das mulheres não gestantes (MNG), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE).....	63
Tabela 2 - Níveis de TNF- α produzidos por monócitos, estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS), em mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os valores estão representados pela mediana e valores mínimo e máximo, entre parênteses.	65
Tabela 3 – Níveis de IL-10 produzidos por monócitos de mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os valores estão representados pela mediana e valores mínimo e máximo, entre parênteses.....	68
Tabela 4 – Níveis de TGF- β 1 produzidos por monócitos de mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os valores estão representados pela mediana e valores mínimo e máximo, entre parênteses.....	71
Tabela 5 – Atividade fungicida e produção de água oxigenada (H ₂ O ₂) por monócitos de mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os valores estão representados pela mediana e valores mínimo e máximo, entre parênteses.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI - meio de ágar infusão de cérebro e coração

BSA - soro albumina bovina

C - complemento

CD – “cluster of differentiation”

CPH - complexo principal de histocompatibilidade

DAF - fator de aceleração e decaimento

EDTA - ethylenediamine tetracetic acid

EGF - fator de crescimento da epiderme

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunenzimático)

GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HCG - hormônio gonadotrófico coriônico

HLA - antígeno leucocitário humano

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio (água oxigenada)

IFN- γ - Interferon gama

IL-1 α - Interleucina 1 alfa IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-2 - Interleucina 2

IL-3 - Interleucina 3

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

KIR - receptor de inibição da célula NK

LIF - fator inibidor de leucemia

LPS - lipopolissacáride de *Escherichia coli* O₅₅B₅

MCP - proteína quimiotática de monócito

mRNA - RNA mensageiro

Mac - molécula de adesão

mM – milimolar

NaOH - hidróxido de Sódio

NK - Natural killer

NO - óxido nítrico

PBMC - células mononucleares de sangue periférico

PBS - salina tamponada com fosfatos, pH 7,2

PBST - salina tamponada com fosfatos, pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05%

PE - pré-eclampsia

PGE₂ - Prostaglandina E2

PIBF - fator bloqueador induzido pela progesterona

PMA - phorbol myristate acetate

RPMI - meio para cultura de células

TGF- β 1 - Fator transformador do crescimento beta 1

TH - linfócitos T *Helper* (auxiliar)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TNF- β - Fator de necrose tumoral beta

SUMÁRIO

Capítulo I

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INTERAÇÃO MATERNO-FETAL.....	03
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

Capítulo II

1. INTRODUÇÃO	36
2. OBJETIVOS	45
3. SUJEITOS E MÉTODOS	48
3.1. Desenho do estudo	48
3.2. Seleção dos sujeitos	48
3.3. Critérios de inclusão	48
3.3.1. Gestantes normais.....	48
3.3.2. Gestantes hipertensas.....	49
3.3.3. Não gestantes.....	49
3.4. Critérios de exclusão	49
3.4.1. Gestantes.....	49
3.4.2. Não gestantes.....	49
3.5. Variáveis	50
3.6. Conceitos	50
3.6.1. Idade gestacional.....	50
3.6.2. Hipertensão arterial.....	50
3.6.3. Proteinúria.....	51
3.6.4. Pré-eclâmpsia.....	51
3.7. Momento e técnica da colheita das amostras para dosagem dos parâmetros bioquímicos e imunológicos	51

3.7.1. Citocinas.....	51
3.7.2. Proteinúria.....	52
3.8. Isolamento e cultura de monócitos	52
3.9. Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos	53
3.10. Dosagem de citocinas	54
3.10.1. Dosagem de Fator de Necrose Tumoral alfa	54
3.10.2. Dosagem de Interleucina 10	55
3.10.3. Dosagem de Fator Transformador do Crescimento beta	56
3.11. Determinação da liberação de água oxigenada (H ₂ O ₂) por monócitos	57
3.12. Cultivo de <i>Candida albicans</i>	58
3.13. Atividade fungicida de monócitos contra <i>Candida albicans</i>	59
3.14. Análise estatística	60
3.15. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	60
4. RESULTADOS	62
4.1. Características clínicas dos grupos estudados	62
4.2. Níveis de TNF- α produzidos por monócitos de mulheres normais, gestantes normais e com pré-eclâmpsia	64
4.3. Níveis de IL-10 produzidos por monócitos de mulheres normais, gestantes normais e com pré-eclâmpsia	67
4.4. Níveis de TGF- β 1 produzidos por monócitos de mulheres normais, gestantes normais e com pré-eclâmpsia	70
4.5. Atividade fungicida e produção de H ₂ O ₂ por monócitos de mulheres normais, gestantes normais e com pré-eclâmpsia.....	73
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8. RESUMO	100
9. ABSTRACT	103
10. ANEXOS	106

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia apresenta-se como complicação em cerca de 5% dos partos, sendo importante causa de morte materna e, estando ainda associada com aumento do risco de morbidade e mortalidade perinatal⁽¹⁾. É uma doença sistêmica, caracterizada por múltiplas alterações do organismo materno, entre as quais se destacam disfunção endotelial difusa, aumento da resistência vascular periférica, alterações da coagulação, deficiência anti-oxidante, elevação persistente de citocinas derivadas de leucócitos maternos e hiperlipidemia⁽²⁾.

Segundo Dekker & Sibai⁽³⁾, a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da pré-eclâmpsia tem como base dois aspectos chaves: a invasão citotrofoblástica endovascular e o processo de lesão e disfunção da célula endotelial. Assim, esses autores propõem quatro hipóteses para explicar a fisiopatologia da pré-eclâmpsia: isquemia da placenta, balanço entre lipoproteínas de baixa densidade e fatores de prevenção da toxicidade, má adaptação imunológica e caráter genético.

A hipótese de má adaptação imunológica está fundamentada em trabalhos, que sugerem ser essa doença causada por resposta imune materna anormal ao desafio antigênico determinado pelo enxerto fetal^(4,5).

O sucesso da implantação e desenvolvimento da placenta depende, em grande parte, do equilíbrio entre interações imunes, protetoras e supressoras, provavelmente mediado por citocinas secretadas na interface materno-fetal⁽⁶⁾.

As citocinas estão envolvidas na resposta imunológica, em reações inflamatórias, no controle da resposta imune materna e no desenvolvimento feto-placentário^(7,8,9). Portanto, podem facilitar ou prejudicar a implantação e evolução da gravidez normal, dependendo do tipo presente, da concentração e do tempo de secreção em relação ao estágio de diferenciação do tecido alvo, com potencial reprodutivo⁽¹⁰⁾. Uma vez que as citocinas estão envolvidas no controle da resposta imune e também têm papel no desenvolvimento fetal, sua liberação a partir da placenta, como consequência de alterações na resposta imune materna, pode preceder a cascata de reações fisiopatológicas observadas na pré-eclâmpsia.

Diferentes citocinas, como Interleucina-1 (IL-1), IL-2, fator de crescimento da epiderme (EGF), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator transformador do crescimento beta (TGF- β) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), podem estar envolvidas na invasão trofoblástica^(11,12,13,14,15,16).

A lesão e disfunção da célula endotelial são eventos comuns a todos os achados patológicos da pré-eclâmpsia, como a diminuição na síntese de prostaciclina, aumento da resistência vascular periférica e da agregação de plaquetas. O fator desencadeante desses distúrbios endoteliais permanece desconhecido. Entretanto, a disfunção endotelial na pré-eclâmpsia parece estar associada à liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias e de radicais livres oxidantes, produzidos por leucócitos ativados, que são a principal fonte dessas substâncias na pré-eclâmpsia^(3, 9,17).

A origem dos fatores que causam a disfunção da célula endotelial não está esclarecida, mas as evidências apontam para a placenta⁽¹⁸⁾.

Redman et al.⁽¹⁹⁾, em artigo de revisão, sugerem que a disfunção endotelial é parte de uma reação inflamatória intravascular generalizada, que envolve leucócitos intravasculares bem como os sistemas de coagulação e complemento. Assim, afirmam que uma resposta inflamatória está presente na gestação normal e que as diferenças entre esta e a pré-eclâmpsia são menos surpreendentes que aquelas entre gestação normal e estado não-gestacional. A pré-eclâmpsia aconteceria quando a resposta inflamatória intravascular materna à gravidez descompensa. Faas & Schuiling ⁽¹⁾ acreditam que quando o zigoto não consegue regular a resposta inflamatória, esta pode persistir e tornar-se generalizada, determinando a manifestação dos sinais de pré-eclâmpsia, que desapareceriam com o término da gestação. Esta falta de condições do zigoto em regular a resposta inflamatória própria da gestação, seria decorrente ou de uma anormalidade, como exemplo a trissomia do cromossoma 13 ^(20,21), ou mesmo que o zigoto seja normal, a resposta inflamatória materna seria muito intensa para o controle do zigoto.

Esses resultados confirmam que a pré-eclâmpsia é uma patologia relacionada a problemas na placentação, resultante de uma ativação anormal do sistema imune inato, que pode desempenhar papel importante na etiologia da pré-eclâmpsia. A ativação excessiva de monócitos e granulócitos intravasculares e de macrófagos, descrita na pré-eclâmpsia sugere que a ativação do sistema imune inato pode também causar problemas na progressão da gestação.

A literatura tem sugerido que a pré-eclâmpsia é o resultado de uma resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias como

monócitos e granulócitos, bem como ativação de células endoteliais, que na verdade fazem parte do sistema inflamatório^(19, 22, 23, 24, 25,).

Vários autores sugerem que monócitos e macrófagos ativados podem estar envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da pre-eclampsia^(23, 26, 27). Segundo Oian et al.⁽²²⁾, o aumento da síntese de tromboplastina por estas células, estimuladas ou não com endotoxinas são evidências da ativação de monócitos de gestantes com pre-eclampsia. Os autores sugerem que essa atividade pode ser decorrente da ativação do sistema complemento, uma vez que a síntese de tromboplastina depende da presença desse sistema. Haeger et al.⁽²³⁾ demonstraram na pré-eclâmpsia a ativação do sistema complemento, representada por níveis séricos elevados de C5 e do complexo C5b-9, além da ativação de neutrófilos e monócitos, detectada pela maior produção de elastase e neopterin respectivamente, presentes na circulação sistêmica. Os autores sugerem que as manifestações patológicas da pré-eclâmpsia grave podem ser resultantes da ativação do sistema complemento sobre a função dos leucócitos polimorfonucleares e monócitos. A ativação de monócitos/macrófagos pelos componentes C5a e C5b-9 induziria maior produção de citocinas, que atuariam como mediadores endógenos potentes na inflamação. Na pré-eclâmpsia grave, as citocinas IL-10, IL-6 e TNF- α , poderiam participar na quimiotaxia e na ativação de neutrófilos, determinando as lesões intravasculares observadas nessa doença⁽²⁴⁾. Outras evidências da ativação de granulócitos e monócitos na pré-eclâmpsia foram descritas recentemente por Sacks et al.⁽²⁵⁾. Os autores encontraram aumento na expressão de marcadores de ativação na superfície de leucócitos do

sangue periférico, assim como na produção de reativos intermediários de oxigênio por essas células.

Monócitos e macrófagos são considerados fontes importantes de citocinas após serem ativados. Os principais mecanismos pelos quais essas células podem ser ativadas são: 1) em consequência da interação com microrganismos e seus produtos, tais como endotoxinas e componentes da parede celular ⁽²⁸⁾; 2) através de citocinas como interferon-gama (IFN- γ) ⁽²⁹⁾, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e, TNF- α ^(30,31). Uma das alterações metabólicas que ocorrem após ativação do macrófago é o aumento das atividades microbicida, fagocítica e citotóxica ^(32,33). Essas alterações envolvem também modificações bioquímicas⁽³⁴⁾, aumento da capacidade de aderência, espraçamento sobre superfícies de vidro ^(35,36), expressão de moléculas de classe II ⁽²⁸⁾, produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e síntese de citocinas inflamatórias como Interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-8 e TNF- α ⁽³⁷⁾.

Os macrófagos e monócitos, além de serem fontes importantes de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 são responsáveis também pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e fator beta transformador do crescimento (TGF- β 1). Todas essas citocinas apresentam atividade estimuladora ou supressora sobre os macrófagos e linfócitos, interagindo com os receptores específicos, presentes nessas células, modulando sua função ⁽³⁸⁾. Citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-8 e GM-CSF são importantes no processo de ativação macrofágica, enquanto outras como IL-6, IL-10 e TGF- β 1 são fatores de desativação do macrófago ^(39,40). O balanço na produção de citocinas supressoras

e estimuladoras pode interferir tanto na resposta imune específica como inespecífica.

Assim, para conter a resposta inflamatória e a ativação de monócitos/macrófagos são produzidas citocinas anti-inflamatórias, capazes de suprimir a produção de várias citocinas. Nos casos em que o estímulo é persistente, este controle pode ser deficiente e pouco eficaz. Dentre as citocinas anti-inflamatórias, produzidas por monócitos e macrófagos, a IL-10 é capaz de diminuir a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em monócitos/macrófagos estimulados com LPS através da degradação de mRNA enquanto que o TGF- β 1 inibe a transcrição do mRNA ⁽⁴¹⁾.

O efeito supressor da IL-10 sobre os monócitos/macrófagos pode ser amplificado em combinação com outras citocinas como a IL-4 e TGF- β 1. Essas citocinas agem sinergicamente com a IL-10 diminuindo a atividade microbicida ⁽⁴¹⁾.

A supressão de macrófagos/monócitos pelo TGF- β 1 causa diminuição da aderência, do espreado e da produção de H₂O₂, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6. A diminuição na produção de TNF- α e IL-1 β pode ser acentuada quando os macrófagos são colocados sob ação de outras citocinas supressoras como IL-10 e IL-6 ^(42,43). A principal fonte de TGF- β 1 durante a inflamação são os macrófagos ⁽⁴⁴⁾, havendo necessidade de ativação dessas células por estímulos, como LPS, para ocorrer produção de TGF- β 1 ativo no sobrenadante ⁽⁴⁵⁾.

As citocinas IL-6, IL-10 e o TGF- β 1 são considerados fatores de desativação de macrófagos ⁽⁴⁰⁾, sendo que o TGF- β apresenta importante atividade supressora sobre essas células. Esse peptídeo é capaz de inibir a

atividade lítica de macrófagos, devido à supressão da síntese de reativos intermediários de oxigênio ⁽⁴⁰⁾ e do nitrogênio ⁽⁴⁶⁾. Além disso, o TGF- β 1 apresenta atividade inibidora sobre a produção e síntese de IL-1- β e TNF- α ^(42,47).

Na literatura, a pesquisa de TNF- α em mulheres com PE tem mostrado resultados conflitantes, ao serem relatados tanto níveis semelhantes aos da gestação normal ^(48,49,50,51,52,53,54), como significativamente aumentados em relação às mesmas ^(7,8,9,17,24,55,56,57,58,59,60). Peraçoli ⁽⁶¹⁾ avaliou a produção do TNF- α em gestantes com PE, determinando os níveis plasmáticos maternos e a capacidade de produção dessa citocina por monócitos estimulados com LPS. Comparando gestantes normais e com PE encontrou níveis aumentados de TNF- α no plasma materno e produzidos por monócitos, estimulados ou não com LPS. Esses resultados demonstram o estado de ativação dessas células *in vivo*.

Também em relação à produção de citocinas anti-inflamatórias a literatura mostra resultados conflitantes. São relatados níveis de IL-10 semelhantes ^(17,62), aumentados ⁽⁶³⁾ e diminuídos ^(64,65), quando comparadas gestantes com pré-eclâmpsia e gestantes normais. Por outro lado, a avaliação do TGF- β 1 no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia, mostra níveis mais elevados em comparação com a gestação normal, porém não se correlacionando com a gravidade da patologia ⁽⁶⁶⁾. Além disso, a detecção dessas citocinas foi realizada apenas no plasma materno, não havendo pesquisa de sua produção por monócitos, tanto na gestação normal como na pré-eclâmpsia.

Apesar da literatura tentar associar os níveis de citocinas com a pré-eclâmpsia ou suas formas graves, o grande questionamento é se esses

mediadores atuariam como fator desencadeante da doença ou seriam produtos da mesma, agindo apenas como fator de desenvolvimento das suas diferentes manifestações clínicas e laboratoriais.

Considerando que monócitos de gestantes normais e com pré-eclâmpsia se encontram ativados e assumem grande importância como células efetoras na produção de citocinas, o estudo da atividade dessas células poderia contribuir para melhor conhecimento de sua participação na gestação normal e na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Billingham RE, Medawar PB. "Actively acquired tolerance" of foreign cells. *Nature* 1953; 172:603-6.
2. Hill JA. Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: a critique of theories and therapy. *Am J Reprod Immunol* 1990; 22:33-41.
3. Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev* 1996; 17:156-86.
4. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14:353-6.
5. Mori W. The Shwartzman reaction: a review including clinical manifestations and proposal for a univisceral or single organ third type. *Histopathology* 1981; 5:113-26.
6. Sacks G, Sargent I, Redman CWG. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 1999; 20:114-8.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997; 126:36-47.

7. Kelemen K, Paldi A, Tinneberg H, Torok A, Szekeres-Bartho J. Early recognition of pregnancy by the maternal immune system. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39:351-5.
8. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994; 266:1508- 18.
9. Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:161-5.
10. Athanassakis I, Blackley RC, Paetkau V, Guilbert L, Barr PJ, Wegmann TG. The immunostimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. *J Immunol* 1987; 138:37-44.
11. Landers DV, Bronson RA, Pavia CS, Stites DP. *Imunologia da Reprodução*. In: Stites DP, Terr AI, editores. *Imunologia Básica*, Rio de Janeiro, RJ, Prentice-Hall do Brasil, 1992. p.155-167.
12. Lenfant F, Fort M, Rodriguez AM, Campan A, Aguerre-Girr M, Sommer E, et al. Absence of imprinting of HLA class Ia genes leads to co-expression of biparental alleles on term human trophoblast cells upon INF- γ induction. *Immunogenetics* 1998; 47:297-304.

13. King A, Hiby SE, Gardner L, Joseph S, Bowen JM, Verma S et al. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors – a review. *Placenta* 2000; 21:S81-5.
14. Münz C, Holmes N, King A, Loke YW, Colonna M, Schild H, et al. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med* 1997; 185:385-91.
15. Weetman AP. The immunology of pregnancy. *Thyroid* 1999; 9:643-6.
16. Athanassakis I, Paffis M, Ranella A, Vassiliadis S. Detection of soluble HLA-G levels in maternal serum can be predictive for a successful pregnancy. *Transpl Proc* 1999; 31:1834-7.
17. King A, Burrows T, Verma S, Hiby SE, Loke YW. Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4:480-5.
18. Moreau P, Paul P, Rouas-Freiss N, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40:136-44.

19. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunol Today* 1999; 20:60-2.
20. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental “graft”: ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:731-7.
21. King A, Loke YW. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 1991; 12:432-5.
22. Maejima M, Fujii T, Kozuma S, Okai T, Shibata Y, Taketani Y. Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38:79-82.
23. Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE *et al*. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 1997; 27:3380-8.
24. Morgan BP. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1995; 32:265-98.
25. Morgan BP, Holmes CH. Immunology of reproduction: protecting the placenta. *Curr Biol* 2000; 10:R381-3.

26. Atkinson JP, Farries TC. Separation of self from non-self in the complement system. *Immunol Today* 1987; 8:212-5.
27. Holmes CH, Simpson KL, Wainwright SD, Tate CG, Houlihan JM, Sawyer IH et al. Preferential expression of the complement regulatory protein decay accelerating factor at the fetomaternal interface during human pregnancy. *J Immunol* 1990; 144:3099-105.
28. Holmes CH, Simpson KL, Okada H, Okada N, Wainwright SD, Purcell DF et al. Complement regulatory proteins at the fetomaternal interface during human placental development: distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). *Eur J Immunol* 1992; 22:1579-85.
29. Holmes CH, Simpson KL. Complement and pregnancy: new insights into the immunobiology of the fetomaternal relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1992; 6:439-60.
30. Tedesco F, Radillo O, Candussi G, Nazzaro A, Mollnes TE, Pecorari D. Immunohistochemical detection of terminal complement complex and S protein in normal and pre-eclamptic placentae. *Clin Exp Immunol* 1990; 80:236-40.

31. Xu C, Mao D, Holers VM, Palanca B, Cheng AM, Molina H. A critical role for murine complement regulator Crry in fetomaternal tolerance. *Science* 2000; 287:498-501.
32. Ryan US. Complement inhibitory therapeutics and xenotransplantation. *Nature Med* 1995; 1:967-8.
33. Koumandakis E, Koumandaki I, Kaklamani E, Sparos L, Aravantinos D, Trichopoulos D. Enhanced phagocytosis of mononuclear phagocytes in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93:1150-4.
34. Shibuya T, Izuchi K, Kuroiwa A, Okabe N, Shirakawa K. Study on nonspecific immunity in pregnant women: increased chemiluminescence response of peripheral blood phagocytes. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 15:19-23.
35. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350:485-7.
36. Knight M, Redman CWG, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:632-40.

37. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gounrand L, Dausset J et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999; 11:803-11.
38. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997; 18:478-82.
39. Iwatani Y, Watanabe M. The maternal immune system in health and disease. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998; 10:453-8.
40. Kuby J. editor. *Cytokines. Immunology*, 3rd ed. New York:WH Freeman and Co.; 1997. p.313-34.
41. Piccinni M-P, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. Role of hormone-controlled Th1 and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol* 2000; 109:30-3.
42. Romagnani S. Human Th1 and Th2: doubt no more. *Immunol Today* 1991; 12:256-7.
43. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-73.

44. Lim KJ, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. Profile of cytokine mRNA expression in peri-implantation human endometrium. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:77-81.
45. Hashimoto K, Ohta N, Ohkura T, Inaba N. Changes in plasma soluble CD26 and CD30 during pregnancy: markers of Th1/Th2 balance? *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50:260-3.
46. Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV. Shifts in the Th1/Th2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245:933-8.
47. Hunt JS, Miller L, Roby KF, Huang J, Platt JS, De Brot BL. Female steroid hormones regulate production of pro-inflammatory molecules in uterine leukocytes. *J Reprod Immunol* 1997; 35:87-99.
48. Olding LB, Papadogiannakis N, Barbieri B, Murgita RA. Suppressive cellular and molecular activities in materno-fetal immune interactions; suppressor cell activity, prostaglandins, and α -fetoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997; 222:159-87.
49. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000; 47:87-103.

50. Piccinni M-P, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL -4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cells clones. *J Immunol* 1995; 155:128-33.
51. Hansen PJ. Regulation of uterine immune function by progesterone – lessons from the sheep. *J Reprod Immunol* 1998; 40:63-79.
52. Szekeres-Bartho J, Autran B, Debre P, Andreu G, Denver L, Chaouat G. Immunoregulatory effects of a supressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell Immunol* 1989; 122:281-94.
53. Szekeres-Bartho J, Faust Z, Varga P. The expression of a progesterone-induced immunomodulatory protein in pregnancy lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:342-8.
54. Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol* 1996; 31:81-95.
55. Sherwood OD. Relaxin. In: Knobil E, Neill E editors. *The physiology of reproduction*, 2nd ed. Raven Press, New York, 1994, p.861-1010.

56. De Smedt D, Menu E, Chaouaut G. Immunoactive products of placenta. VI. Induction of transient murine T cell anergy by a low-molecular-weight compound obtained from supernatants of human placental cultures. *Cell Immunol* 1997; 175:128-40.
57. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T et al. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- γ . *J Immunol* 1995; 154:4261-8.
58. Lea RG, Underwood J, Flanders KC, Hirte H, Banwatt D, Finotto S et al. A subset of patients with recurrent spontaneous abortion is deficient in transforming growth factor beta-2-producing "supressor cells" in uterine tissue near the placental attachment site. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:52-64.
59. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359:76-9.

60. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil* 1994; 101:421-6.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a atividade de monócitos em gestantes normais e em portadoras de pré-eclâmpsia, avaliadas no terceiro trimestre da gestação.

2.2. Objetivos Específicos

- Quantificar e comparar a produção das citocinas IL -10, TNF- α e TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de monócitos, estimulados ou não com lipopolissacáride de *Escherichia coli*, em mulheres não gestantes, gestantes normais e gestantes com pré-eclâmpsia.

- Quantificar e comparar a atividade fungicida de monócitos de sangue periférico contra *Candida albicans*, em mulheres não gestantes, gestantes normais e gestantes com pré-eclâmpsia.

- Quantificar e comparar a liberação de água oxigenada por monócitos de sangue periférico, em mulheres não gestantes, gestantes normais e gestantes com pré-eclâmpsia.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Foi conduzido um estudo observacional prospectivo.

3.2. Seleção dos sujeitos

As gestantes portadoras de pré-eclâmpsia foram selecionadas da população de mulheres internadas na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

As gestantes normais foram selecionadas da população de mulheres acompanhadas no Ambulatório de Pré-natal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

As não gestantes foram escolhidas ao acaso, na população de mulheres atendidas no Ambulatório de Prevenção do Câncer Ginecológico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Para compor a casuística do estudo foi considerada elegível a gestante que preencheu os critérios de inclusão relacionados abaixo.

3.3. Critérios de inclusão

3.3.1. Gestantes normais

Ser primigesta, normotensa, com gestação única e idade gestacional entre 28 e 40 semanas.

3.3.2. Gestantes hipertensas

Ser primigesta, com gestação única, idade gestacional entre 28 e 40 semanas e apresentar hipertensão arterial associada com proteinúria (pré-eclâmpsia).

3.3.3. Não gestantes

Ser nulípara, não estar grávida e pareada por idade com o grupo de gestantes.

3.4. Critérios de exclusão

3.4.1. Gestantes

Presença de intercorrências clínicas ou obstétricas e trabalho de parto.

3.4.2. Não gestantes

Presença de intercorrências clínicas.

Ao final deste processo as pacientes elegíveis foram esclarecidas sobre o propósito do estudo e convidadas a participarem do mesmo. Ao aceitarem assinavam termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

3.5. Variáveis

Para todas as gestantes foram obtidos os seguintes dados: idade, idade gestacional, pressão arterial, dosagem de proteinúria e de citocinas (TNF- α , IL-10, TGF- β) produzidas por monócitos com e sem estímulo por LPS. Para as mulheres não gestantes foram obtidos os seguintes dados: idade, pressão arterial e dosagem de citocinas (TNF- α , IL-10, TGF- β) produzidas por monócitos, com e sem estímulo por LPS. Além disso, tanto para mulheres normais como para as gestantes, foi avaliada a atividade fungicida de monócitos contra *Candida albicans* e a produção de H₂O₂ por essas células.

3.6. Conceitos

3.6.1. Idade gestacional

A idade gestacional foi determinada pela data da última menstruação e/ou ultra-som realizado no início da gestação.

3.6.2. Hipertensão arterial

Foi considerada hipertensão arterial quando o valor da pressão arterial, após duas ou mais medidas sucessivas, por esfigmomanômetro, estando a paciente sentada, manteve-se em valores iguais ou superiores a 140 x 90 mmHg.

3.6.3. Proteinúria

A proteinúria foi quantificada em mg/24h, 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.

3.6.4. Pré-eclâmpsia

As gestantes tiveram diagnóstico de pré-eclâmpsia quando, sem história de hipertensão arterial prévia à gestação, permaneceram normotensas na primeira metade da mesma, manifestando após a 20^a semana, hipertensão arterial associada à proteinúria. Considerou-se proteinúria quando, em urina de 24 horas, foram detectados pelo menos 300 mg de proteína.

3.7. Momento e técnica da colheita das amostras para dosagem dos parâmetros bioquímicos

3.7.1. Citocinas

3.7.1.1. Gestantes

As amostras de sangue, para dosagem de TNF- α , IL-10 e TGF- β 1, foram obtidas no terceiro trimestre da gestação. Foram colhidos 10 mL de sangue periférico por punção venosa, em tubo estéril contendo 10 U/mL de heparina (Liquemine Roche).

3.7.1.2. Não gestantes

As amostras de sangue, para dosagem de TNF- α , IL-10 e TGF- β 1, foram obtidas uma única vez. Foram colhidos 10 mL de sangue periférico por punção venosa, em tubo estéril contendo 10 U/mL de heparina (Liquemine Roche).

3.7.2. Proteinúria

A urina para dosagem de proteinúria foi obtida na gestação, no dia da colheita de sangue para dosagem de citocinas. Foi colhida e armazenada em frascos devidamente preparados, durante o período de 24 horas.

3.8. Isolamento e cultura de monócitos

Sangue periférico de mulheres normais, gestantes normais e com pré-eclâmpsia foi colhido por punção venosa, sendo 10 mL colocados em tubo estéril, contendo 20U/mL de heparina (Liquemine, Roche). O plasma foi obtido por centrifugação a 200 x g por 10 min a 4 °C e as células mononucleares recuperadas por meio de separação em gradiente de Ficoll-Hypaque, segundo técnica descrita por Böyum ⁽⁶⁷⁾. O anel rico em linfócitos e monócitos foi lavado inicialmente com solução gelada de EDTA/PBS, 0,01M por centrifugação a 200 x g durante 10 min e logo após, com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chemical Co. USA) por mais 10 min a 200 x g. Após esse período, a suspensão celular foi ressuspensa em meio de cultura RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina

(Sigma Chemical Co., USA), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro AB humano inativado (RPMI completo), sendo a identificação e a viabilidade das células estimadas por incorporação pelo vermelho neutro. Para isso, foram incubados 50 µL da suspensão celular com 450 µL de vermelho neutro a 0,02% durante 10 min a 37 °C. Os monócitos foram identificados pela incorporação do corante e a concentração celular ajustada para 1×10^6 monócitos viáveis/mL, após contagem em câmara hemocitométrica. A seguir a suspensão celular foi distribuída em placas de cultura de 24 orifícios (Linbro, Flow Lab, USA) e após 60 min de incubação a 37 °C, em tensão de 5% de CO₂, as células não aderentes foram eliminadas através de lavagem das placas com pipeta Pasteur. Um volume de 1 mL de meio RPMI completo foi adicionado a cada orifício da placa, para o cultivo dos monócitos.

3.9. Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos

Os monócitos obtidos conforme descrito no ítem anterior foram incubados a 37 °C, em tensão de 5% de CO₂, na ausência (cultura controle) ou presença de 10 µg/mL de lipopolissacáride de *Escherichia coli*, O₅₅B₅ (cultura teste). Após 24 horas os sobrenadantes foram aspirados, centrifugados a 400 x g e, alíquotas desse material, conservadas a -70 °C até o momento de sua utilização para dosagem das citocinas.

3.10. Dosagem de citocinas

A pesquisa de citocinas em sobrenadantes de cultura de monócitos, estimulados ou não com LPS, foi realizada pela técnica de ELISA, utilizando-se placas de 96 orifícios e fundo plano (Maxsorb-NUNC) e anticorpos monoclonais e policlonais anti-citocina específica. As concentrações dos anticorpos, utilizadas nas reações, foram as recomendadas pelo fabricante.

3.10.1. Dosagem de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)

As placas foram sensibilizadas por 18 h a 5°C com anticorpo monoclonal (Genzyme, Corp. Boston, MA), diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2. Após este período os orifícios foram lavados 4 vezes com 300 μ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). O bloqueio da placa foi realizado colocando-se em cada orifício 300 μ L de PBST contendo 1% de soro albumina bovina (BSA – Sigma Chemical Co., USA), 5% de sacarose e 0,05% de azida sódica (NaN_3), à temperatura ambiente por 2 h. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100 μ L dos sobrenadantes gerados e dos padrões de citocinas recombinantes, em diferentes concentrações, foram adicionados à placa. Após 18 h de incubação a 5°C e nova lavagem da placa, o anticorpo revelador policlonal anti-citocina (Genzyme, Corp. Boston, MA) foi adicionado e incubado por 2 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionado 100 μ L de anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Nordic

Immunology, The Netherlands) na diluição de 1:8000 em PBST, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 60 min e lavagem da placa com PBST. Após esses procedimentos, adicionou-se 100 µL do substrato enzimático, contendo 10µL de H₂O₂ a 30 % (Sigma Chemical Co., USA), diluídos em 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e 5 mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma Chemical Co., USA). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min. O bloqueio da reação foi realizado por adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 492 nm. A concentração de TNF-α nas amostras foi calculada utilizando-se curva padrão, obtida com TNF-α recombinante (Genzyme, Corp. Boston) empregado em concentrações variando de 31,25 pg/mL a 2000 pg/mL.

3.10.2. Dosagem de Interleucina 10 (IL-10)

As placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti -IL-10 (R & D Systems), na concentração de 2µg/mL, diluído em PBS, por um período de 18 h a 5°C. Após a sensibilização a placa foi lavada com PBST, bloqueada com PBST contendo 5% de sacarose, 1% de BSA e 0,05% de azida sódica (NaN₃). O período de bloqueio foi de 2 h à temperatura ambiente, seguindo-se 4 lavagens da placa com 300 µL de PBST. As amostras testes foram colocadas nos orifícios e incubadas por 2 h à temperatura ambiente. Ao mesmo tempo a IL-10 recombinante (R & D Systems) foi diluída em tampão Tris-salina (Trizma-base 20mM, NaCl 150mM) adicionado de 0,1% de soro albumina bovina (BSA) e,

concentrações variando de 15,6 a 2000 pg/mL, foram colocadas na placa para obtenção da curva padrão do ensaio.

Após a retirada das amostras da placa e posterior lavagem, adicionou-se 100 µL de anticorpo anti-IL-10 conjugado com biotina (R & D Systems), com posterior incubação de 2 h à temperatura ambiente. A placa foi então lavada 4 vezes com PBST e incubada com streptoavidina conjugada com peroxidase (Sigma Chemical Co., USA), na concentração de 1:10000 por 60 min a 37°C.

O substrato utilizado foi o mesmo descrito para dosagem de TNF- α . O tempo de reação foi de 30 min e o bloqueio realizado com ácido sulfúrico 2 M. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 492 nm.

3.10.3. Dosagem do Fator Transformador do Crescimento beta 1 (TGF- β 1)

Para permitir a ligação do TGF- β 1, presente nas amostras, ao receptor específico adsorvido à placa, os sobrenadantes passaram por um processo de acidificação. Assim, adicionou-se 20 µL de HCl 1N para cada 100 µL de amostra, seguindo-se de homogeneização e incubação por 10 min à temperatura ambiente. Após este período as amostras foram neutralizadas com 20 µL de NaOH 1,2N com 0,5M de Hepes.

A sensibilização da placa foi realizada adicionando-se 100µL de receptor para TGF- β 1 (sRII/quimérico - R & D System) na concentração de 150 ng/mL e incubação por 18 h à temperatura de 5°C. Após este período a placa foi lavada 4

vezes com 300 µL de PBST e bloqueada com PBS 5% de Tween 20 adicionado de 5% de sacarose e 0,05% de NaN₃ por um período de 2 h à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas 4 vezes com 300 µL de PBST, sendo adicionadas as amostras e TGF-β1 recombinante (R & D System), em concentrações variando de 31,25 a 2000 pg/mL. Essa citocina foi diluída em Opticlear, tampão recomendado pelo fabricante, colocado na placa em volumes de 100 µL, seguindo-se incubação por 2 h à temperatura ambiente.

As amostras testes foram previamente acidificadas para serem submetidas à dosagem. Após 2 h de incubação as placas foram lavadas com PBST, sendo adicionado anticorpo anti -TGF-β1 biotinilado (R & D System). As condições de incubação com avidina, substrato e a leitura da reação foram semelhantes às descritas para dosagem de IL-10.

3.11. Determinação da liberação de água oxigenada (H₂O₂) por monócitos

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por Pick & Keisari ⁽⁶⁸⁾ e adaptado por Pick & Mizel ⁽⁶⁹⁾.

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes e de indivíduos controles foram obtidas de acordo com o item 3.8. A concentração celular foi ajustada para 2x10⁶ células totais/mL e 100 µL dessa suspensão (2x10⁵) foram distribuídos em placas de culturas de células de fundo plano, contendo 96 orifícios, incubadas por 60 min à 37 °C em tensão de 5% de CO₂. Após este período, as células não aderentes foram retiradas e a placa lavada 2

vezes com meio RPMI. Em seguida, foram adicionados em cada orifício 100 µL de solução tampão contendo: 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato, pH 7; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho fenol; 0,01 mg/mL de peroxidase tipo II (Sigma, Chemical Co USA) e 1 mg de "Phorbol Mirestate Acetate" (PMA). Após 60 min a 37 °C a reação foi interrompida pela adição de 10 µL de NaOH 1N. As amostras foram ensaiadas em quadruplicata. A absorbância foi determinada em leitor automático de ELISA, com filtro de 620 nm, com um branco constituído de solução de vermelho fenol e NaOH 1N.

Os resultados foram expressos em nanomoles de $\text{H}_2\text{O}_2/2 \times 10^5$ células, a partir de curva padrão que foi estabelecida em cada ensaio, constituída com concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho fenol.

3.12. Cultivo da *Candida albicans*

Foi utilizada a cepa H1585 de *Candida albicans*, mantida no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu, através de cultivo em meio Sabouraud a 37 °C em tubos de 20 x 20 mm. As culturas foram empregadas após 24 horas de cultivo.

3.13. Atividade Fungicida de Monócitos contra *Candida albicans*

Após a realização da cultura de monócitos (conforme descrito no item 3.8). A concentração celular foi ajustada para 2×10^6 células totais/mL e foi adicionada à

cultura uma suspensão de *C. albicans* preparada em meio RPMI contendo 10% (v/v) de soro AB fresco, na proporção de 1 fungo para cada 25 monócitos (cultura experimental), sendo a cultura incubada por 2 horas e 30 min a 37 °C em tensão de 5% de CO₂. Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas as suspensões controles do fungo em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com as monocamadas de monócitos (cultura controle).

Em seguida, as culturas experimental e controle foram submetidas à diversas lavagens com um volume de água destilada estéril, procedimento que permite o crescimento de, no máximo, 200 colônias de fungo por placa, tornando a leitura das mesmas mais sensíveis. Dessa suspensão em água destilada foram semeados 0,1 mL contendo fungos viáveis ou não, em triplicatas, em placas contendo meio de ágar infusão de cérebro e coração (BHI –Difco) com incubação a 37 °C por 24h. A atividade fungicida foi expressa pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade Fungicida} = 1 - [\text{média das culturas experimentais} / \text{média culturas controle}] \times 100$$

3.14. Análise estatística

Os resultados foram analisados empregando-se testes não paramétricos. Na comparação entre os níveis de citocinas detectados em sobrenadantes das culturas de monócitos estimuladas ou não com LPS, tanto para mulheres normais como para gestantes normais e com pré-eclampsia, adotou-se o teste de Wilcoxon

para amostras pareadas. Na análise comparativa entre os níveis de citocinas, produção de H_2O_2 e atividade fungicida de monócitos contra *C.albicans* foram utilizados os teste de Kruskal-Wallis para a análise entre os 3 grupos estudados e o teste U de Mann-Whitney para amostras independentes, na comparação entre gestante normais e portadoras de pré-eclampsia. Todas as análises estatísticas foram realizadas de acordo com Godfrey ⁽⁷⁰⁾ e o nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

3.15. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento esclarecido, sendo o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (Anexo 2).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS

Do presente estudo participaram 25 mulheres normais não grávidas (MN) e 50 gestantes primigestas, sendo 20 normais (GN) e 30 com pré-eclâmpsia (PE).

Na Tabela 1 são apresentadas as características clínicas da população estudada, representadas pela mediana e valores mínimo e máximo de idade, idade gestacional e proteinúria. Em relação à idade não foi observada diferença estatística entre os grupos analisados. Entre os grupos de gestantes, a idade gestacional também não apresentou diferença significativa. Somente as gestantes com pré-eclâmpsia apresentaram proteinúria, cuja mediana foi de 1600 mg, com variação entre 300 mg e 16000 mg.

Tabela 1 – Características clínicas das mulheres não gestantes (MNG), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE).

Características	GRUPOS			Significância*
	MN (n= 25)	GN (n= 20)	PE (n= 30)	
Idade (anos)	22 (19-36)	19 (16-30)	21 (16-39)	NS
Idade gestacional (semanas)	—	34 (26-38)	35 (27-40)	NS
Proteinúria (mg/24 horas)	Negativa	Negativa	1600 (300 – 16000)	

Os resultados são expressos em mediana, com os valores mínimo e máximo entre parênteses.

* (p<0,05) Kruskal-Wallis (ANOVA)

4.2. NÍVEIS DE TNF- α PRODUZIDOS POR MONÓCITOS DE MULHERES NORMAIS, GESTANTES NORMAIS E COM PRÉ-ECLÂMPsia

Na tabela 2 estão expressas as medianas com os valores mínimo e máximo obtidos no estudo da produção de TNF- α por monócitos, estimulados ou não com LPS em mulheres normais não grávidas (MN), gestantes normais (GN) e em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE). Os valores dessa citocina apresentaram aumento significativo após estímulo dos monócitos com LPS, em todos os grupos analisados (Tabela 1 - teste de Wilcoxon).

A comparação entre os três grupos, com relação aos níveis endógenos de TNF- α , detectados no sobrenadante de monócitos cultivados sem estímulo, mostra valores significativamente mais elevados nas gestantes normais e nas com pré-eclâmpsia em comparação ao grupo de mulheres normais, sugerindo que os monócitos se encontram ativados durante a gestação. A comparação entre GN e PE pelo teste de Mann-Whitney não mostrou diferença significativa entre esses dois grupos. (Figura 1).

Após estímulo dos monócitos com LPS, verifica-se que os níveis de TNF- α produzidos pelo grupo de gestantes normais foram significativamente mais elevados em comparação a mulheres normais, não grávidas e gestantes com pré-eclâmpsia (Figura 1).

Tabela 2 – Níveis de TNF- α produzidos por monócitos, estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS), em mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE).

TNF- α (pg/mL)			
GRUPOS	Sem estímulo	Estímulo com LPS	Significância *
MN (n = 25)	166,3 (56,1– 382,7)	1028,9 (487,1 – 1264,7)	p< 0,0001
GN (n = 20)	710,0 (89,0 – 1716,0)	1840,0 (1086,0 – 3088,0)	p< 0,0001
PE (n = 30)	644,5 (119,0 – 2307,0)	1423,5 (328,0 – 2718,0)	p< 0,0001

Os valores estão representados pela mediana e valores mínimo e máximo, entre parênteses

* *teste de Wilcoxon*

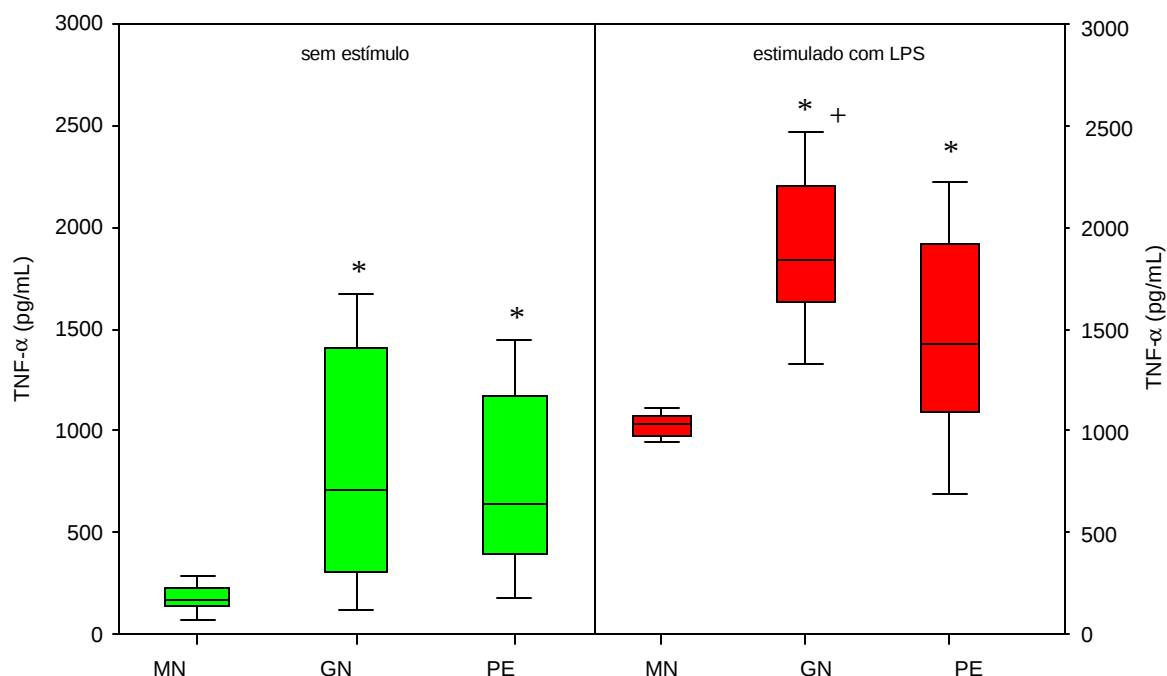


Figura 1- Box-plot representando os níveis de TNF- α produzidos por monócitos estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS) em mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os quadrantes superior e inferior representam os percentis 75 e 25 respectivamente e, o traço horizontal a mediana de cada grupo. As barras de erro representam os percentis 90 e 10.

* ($p < 0,01$) GN, PE x MN – *Kruskal-Wallis (ANOVA)*

+ ($p < 0,05$) GN x PE – *Teste U de Mann-Whitney*

4.3. NÍVEIS DE IL-10 PRODUZIDOS POR MONÓCITOS DE MULHERES NORMAIS, GESTANTES NORMAIS E COM PRÉ-ECLÂMPsia

Os níveis de IL-10 detectados no sobrenadante de cultura de monócitos obtidos de mulheres normais, estimulados ou não com LPS, foram significativamente mais baixos quando comparados aos produzidos pelas gestantes normais e com pré-eclâmpsia (Tabela 3 e Figura 2).

Após estímulo das culturas com LPS observou-se a produção de níveis de IL-10 significativamente mais elevados nas culturas de monócitos obtidos dos três grupos estudados, em comparação as culturas não estimuladas (Tabela 2 – teste de Wilcoxon).

Tabela 3 – Níveis de IL-10 produzidos por monócitos de mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE).

GRUPOS	IL-10 (pg/mL)		Significância *
	Sem estímulo	Estímulo com LPS	
MN (n = 25)	294,7 (0 – 585,5)	873,7 (2116,8 – 2499,1)	p< 0,0001
GN (n = 20)	1330,0 (166,0 – 7452,0)	5456,0 (579,0 – 14163,0)	p< 0,0001
PE (n = 30)	1414,0 (166,0 – 11860,0)	2850,0 (82,0 – 17199,0)	p< 0,0001

Os valores estão representados pela mediana e valores máximo e mínimo.

* teste de Wilcoxon

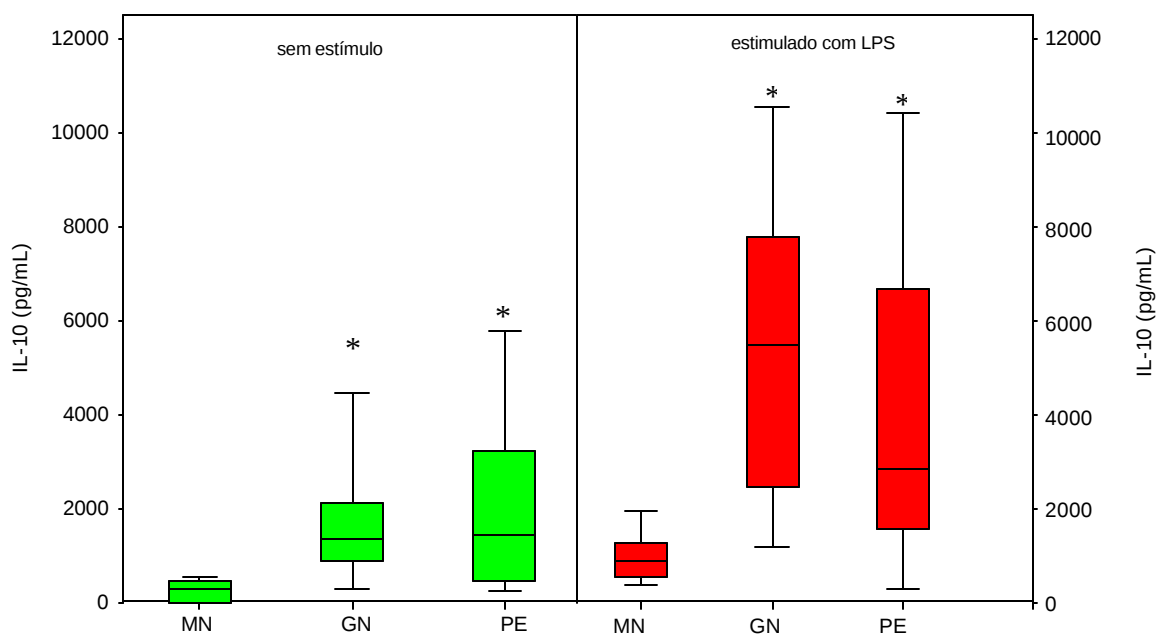


Figura 2- Box-plot representando os níveis de IL-10 produzidos por monócitos estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS) em mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os quadrantes superior e inferior representam os percentis 75 e 25 respectivamente e, o traço horizontal a mediana de cada grupo. As barras de erro representam os percentis 90 e 10.

* ($p < 0,01$) GN, PE x MN – *Kruskal-Wallis (ANOVA)*

4.4. NÍVEIS DE TGF- β 1 PRODUZIDOS POR MONÓCITOS DE MULHERES NORMAIS, GESTANTES NORMAIS E COM PRÉ-ECLÂMPسيا

Na Tabela 4 estão expressas as medianas com os valores mínimo e máximo obtidos no estudo da produção de TGF- β 1 por monócitos estimulados ou não com LPS em mulheres normais não grávidas (MN), gestantes normais (GN) e gestantes portadoras de pré-eclâmpسيا (PE). Os níveis endógenos dessa citocina, produzidos nas culturas, não estimuladas, foram significativamente mais elevados nos grupos de gestantes normais e de gestantes com pré-eclâmpسيا, em comparação aos obtidos em mulheres normais (Tabela 4 e Figura 3).

Após o estímulo das culturas de monócitos com LPS, apenas o grupo de mulheres normais apresentou níveis de TGF- β 1 significativamente mais elevados (teste de Wilcoxon, Tabela 4). Nos grupos de gestantes normais e com pré-eclâmpسيا a produção de TGF- β 1 pelos monócitos, após estímulo com LPS, mostrou níveis semelhantes aos endógenos da citocina, não havendo diferença significativa entre os valores obtidos antes e após estímulo com LPS (Figura 3).

Os níveis de TGF- β 1, obtidos após cultivo com LPS e produzidos por monócitos de gestantes normais, não apresentaram diferença significativa em relação aos detectados nas culturas de monócitos de gestantes com pré-eclâmpسيا. Esses resultados sugerem que as células de ambos os grupos de gestantes já se encontravam ativadas *in vivo*, não sendo estimuladas *in vitro* quando do cultivo com LPS (Figura 3).

Tabela 4 – Níveis de TGF- β 1 produzidos por de monócitos de mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE).

GRUPOS	TGF- β 1 (pg/mL)		Significância *
	Sem estímulo	Estímulo com LPS	
MN (n = 25)	401,1 (112,8– 708,0)	1173,1 (744,3 – 1866,5)	p< 0,0001
GN (n = 20)	1438,0 (876,0 – 2485,0)	1475,0 (1003,0 – 11190,0)	NS
PE (n = 30)	1367,5 (712,0 – 2867,0)	1292,5 (673,0 – 2750,0)	NS

Os valores estão representados pela mediana e valores máximo e mínimo

* teste de Wilcoxon

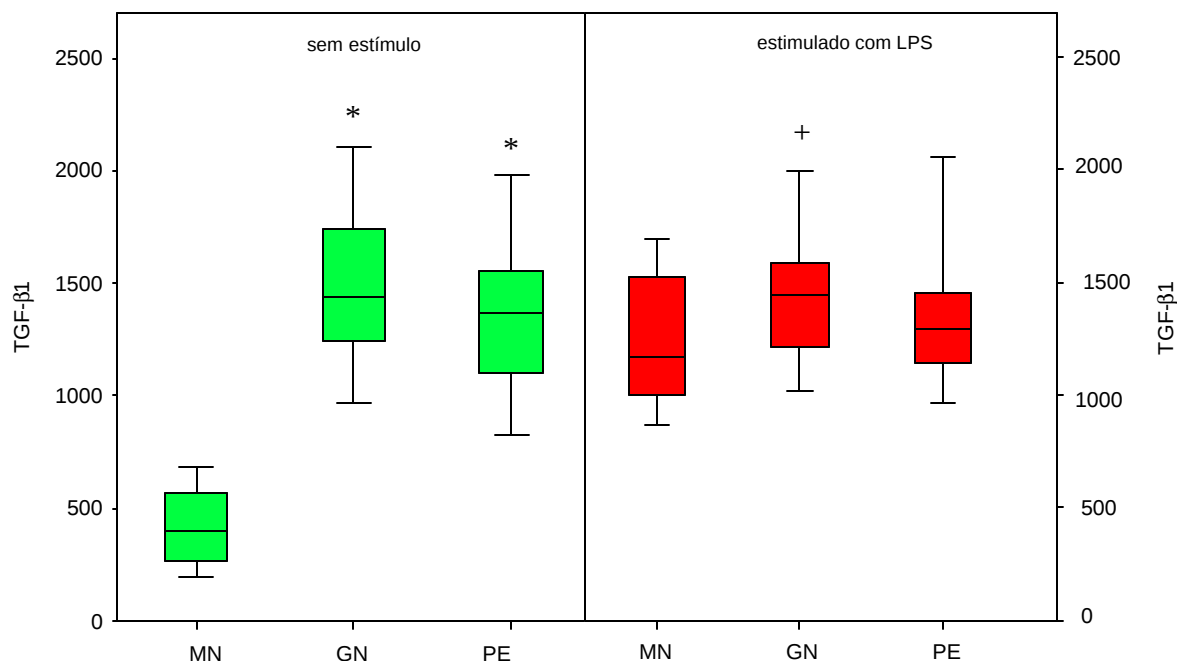


Figura 3- Box-plot representando os níveis de TGF- β produzidos por monócitos estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS) em mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE). Os quadrantes superior e inferior representam os percentis 75 e 25 respectivamente e, o traço horizontal a mediana de cada grupo. As barras de erro representam os percentis 90 e 10.

* ($p < 0,01$) GN, PE x MN; + ($p < 0,05$) GN x PE – *Kruskal-Wallis (ANOVA)*

4.5. ATIVIDADE FUNGICIDA E PRODUÇÃO DE H_2O_2 POR MONÓCITOS DE MULHERES NORMAIS, GESTANTES NORMAIS E COM PRÉ-ECLÂMPsia

Na Tabela 5 estão expressos os resultados da atividade fungicida e da produção de H_2O_2 por monócitos de mulheres normais não grávidas (MN) e de gestantes normais (GN) e portadoras de pré-eclâmpsia (PE). A análise da atividade fungicida dessas células contra *C.albicans* demonstra não haver diferença significativa entre os grupos.

Os níveis basais de H_2O_2 detectados na cultura de monócitos não tratados com PMA foram semelhantes nos três grupos estudados. Entretanto, após estímulo com PMA observam-se níveis significativamente mais elevados desse metabólito, produzidos pelos monócitos de gestantes normais em comparação com mulheres normais (teste de Kruskal-Wallis) e com gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (teste U de Mann-Whitney). Esses resultados sugerem maior capacidade de produção de H_2O_2 pelos monócitos de gestantes normais.

Tabela 5 – Atividade fungicida e produção de água oxigenada (H₂O₂) por monócitos de mulheres normais (MN), gestantes normais (GN) e com pré-eclâmpsia (PE).

GRUPOS	Atividade fungicida (%)	H ₂ O ₂ (nM)	
		Sem PMA	Com PMA
MN (n = 21)	29,9 (0 – 89,7)	0,37 (0 – 3,4)	3,81 (0,1 – 9,0)
GN (n = 18)	14,0 (0 – 48,0)	0,96 (0 – 12,1)	6,90 * + (2,30 – 12,7)
PE (n = 30)	14,82 (0 – 100,0)	0,65 (0 – 7,4)	5,25 (0,07 – 16,1)

Os valores estão representados pela mediana e valores mínimo e máximo

* ($p < 0,01$) MN x GN – *Kruskal-Wallis*

+ ($p < 0,05$) GN x PE – *Teste U de Mann-Whitney*

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o estado de ativação de monócitos do sangue periférico de gestantes com pré-eclâmpsia pela análise da produção das citocinas TNF- α , IL-10 e TGF- β 1, liberação de H₂O₂ e atividade fungicida dessas células contra *C.albicans*. Os métodos empregados estão relacionados com a avaliação da função de células da imunidade inata, envolvidas na reação inflamatória. Assim, poderiam testar a hipótese de que, células do sangue periférico estão ativadas na pré-eclâmpsia.

Na pré-eclâmpsia os trabalhos realizados com o objetivo de avaliar a atividade funcional de monócitos são escassos.

A análise dos resultados referentes à produção de TNF- α endógeno, detectada no sobrenadante de cultura de monócitos não estimulados com LPS, demonstrou níveis significativamente mais elevados da citocina em gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia, em comparação com mulheres normais (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos na determinação dos níveis endógenos de IL-10 e de TGF- β 1 (Figuras 2 e 3). A comparação entre os dois grupos de gestantes, normais e com pré-eclâmpsia, não mostrou diferença com relação à produção espontânea das três citocinas estudadas. Os resultados sugerem que os monócitos se encontram ativados durante a gestação. A produção espontânea elevada dessas citocinas indica que as gestantes, tanto normais como com pré-eclâmpsia se encontram em estado inflamatório, com os

monócitos pré-ativados *in vivo*, quando comparadas às mulheres normais não grávidas.

Há evidências de ativação de leucócitos durante a gestação normal. Aumento do número de monócitos e granulócitos é observado desde o primeiro trimestre até o final da gestação ⁽⁷¹⁾. Essas células circulantes no sangue periférico apresentam fenótipo de células ativadas, com aumento na capacidade fagocítica e microbicida, devido a aumento do metabolismo oxidativo e produção de citocinas ^(71,72,73). A expressão de moléculas CD14, receptor para a endotoxina LPS, está aumentada em monócitos de gestantes normais e, em resposta à endotoxina, essas células produzem níveis mais elevados de IL-12, confirmando o estado de ativação ⁽⁷¹⁾.

Estudos anteriores sobre a ativação de monócitos e macrófagos na pré-eclâmpsia foram apresentados por Schrocksnadel et al. ⁽²⁶⁾, que observaram níveis séricos elevados de IL-6, TNF- α e neopterina em gestantes com essa patologia, sugerindo o envolvimento dessas células no mecanismo patogênico da doença. Berge et al. ⁽⁷⁴⁾, avaliando a atividade de células fagocitárias na pré-eclâmpsia, demonstraram que monócitos circulantes eram mais ativos nessa patologia e produziam mais radicais livres. Assim, tanto os radicais livres oxidantes como o TNF- α podem causar as alterações endoteliais, características da doença.

Sacks et al. ⁽²⁵⁾, estudando ativação de leucócitos circulantes em gestantes normais e com pré-eclâmpsia, pela técnica de citometria de fluxo, observaram que granulócitos e monócitos de ambos os grupos se encontravam ativados, com expressão aumentada de moléculas CD11b (β 2 integrina que se liga à molécula

de adesão intercelular-ICAM-1), CD14 (receptor para LPS) e CD64 (receptor de alta afinidade para IgG), em comparação às células de mulheres normais, não grávidas. Na pré-eclâmpsia, além dessas alterações foi observado aumento intracelular de reativos intermediários do oxigênio. Alterações significativas de leucócitos intravasculares, na gestação normal, levou Redman et al. ⁽¹⁹⁾ a sugerirem que a pré-eclâmpsia pode ser resultante da exacerbação de um processo inflamatório generalizado, natural da gravidez.

Segundo trabalhos recentes, a ativação sistêmica da imunidade inata durante a gestação poderia representar um mecanismo importante de defesa contra infecções, uma vez que a imunidade adquirida, mediada por linfócitos, se encontra relativamente diminuída nesse período ^(65,67).

Produtos placentários e fetais, liberados diretamente na circulação materna, podem ser eliminados por fagocitose, o que levaria a ativação dos fagócitos circulantes ^(75,76). Mesmo na ausência de fagocitose, membranas lipídicas podem estimular monócitos por ligação a receptores CD14 e CD11b ^(67,77). A ativação de monócitos poderia gerar a liberação de citocinas, mediadores lipídicos e radicais livres, capazes de modular a resposta imune materna. Portanto, as citocinas pró-inflamatórias parecem ser responsáveis, em parte, pela maior expressão de moléculas de superfície nos leucócitos de gestantes normais e com pré-eclâmpsia. Além disso, a exposição crônica de lipídios ou proteínas feto-placentárias na circulação materna poderia ativar essas células induzindo um efeito semelhante⁽²⁵⁾.

Nossos resultados de produção espontânea de TNF- α , IL-10 e TGF- β 1, na gestação normal e na pré-eclâmpsia, falam a favor dessa hipótese.

Após estímulo dos monócitos com LPS verificou-se que os níveis de TNF- α e de IL-10 foram significativamente mais elevados nos três grupos estudados, sugerindo que a capacidade de produção dessas citocinas não está afetada durante a gestação (Tabelas 1 e 2). Entretanto, os níveis de IL-10 e TNF- α foram mais elevados tanto nas gestantes normais quanto nas com pré-eclâmpsia, quando comparados a mulheres não grávidas (Figuras 1 e 2). Mais uma vez os resultados mostram que os monócitos se apresentam ativados e com maior capacidade de produção de citocinas durante a gestação. No entanto, observou-se também diferença significativa entre grávidas normais e com pré-eclâmpsia, sendo que estas últimas mostraram uma menor produção de TNF- α após estímulo com LPS (Figura 1). A menor capacidade de produção de TNF- α pelos monócitos estimulados com LPS, em gestantes com pré-eclâmpsia, sugere o controle da produção da citocina nessa patologia da gestação.

Esse fenômeno poderia estar relacionado ao seqüestro de células maduras, produtoras da citocina na interface materno-fetal, uma vez que Hennessy et al.⁽⁶⁴⁾, demonstraram em placentas de gestantes com pré-eclâmpsia, maior número de células produtoras de TNF- α em relação a gestantes normais. Além disso, outros fatores decorrentes da lesão endotelial observada na pré-eclâmpsia, poderiam interferir com a capacidade de produção de TNF- α por monócitos, estimulados com LPS. Segundo Fearon & Locksley ⁽⁷⁷⁾ monócitos podem ser ativados por lipídios de membrana, através da ligação aos receptores CD14 e CD11b, de

maneira análoga à ativação induzida por LPS. Portanto, na pré-eclâmpsia, esses lipídios, interagindo *in vivo* com monócitos, poderiam se ligar ao receptor CD14 e competir com o LPS, quando essas células são estimuladas *in vitro* com a endotoxina, diminuindo assim, a capacidade de produção de TNF- α .

Por outro lado, na pré-eclâmpsia, deve-se considerar que a estimulação crônica *in vivo* de monócitos, poderia induzir um estado de tolerância à ativação por LPS, conforme já foi descrito na sepse ^(78,79). Randow et al.⁽⁷⁹⁾ estudando o mecanismo de tolerância de monócitos ao LPS, verificaram que a exposição à endotoxina, mesmo em baixas concentrações, induz menor produção de TNF- α e IL-1, na resposta ao desafio com uma segunda dose de LPS.

Tanto nas gestantes normais como nas com pré-eclâmpsia foram observados níveis elevados de IL-10, produzidos por monócitos antes e após estímulo com LPS, em comparação a mulheres normais, não grávidas. Na literatura, a maioria dos trabalhos relata níveis de IL-10 no plasma de gestantes normais, semelhantes às com pré-eclâmpsia ^(17,62,80).

Hennesy et al. ⁽⁶⁴⁾ avaliando a presença de IL-10 e TNF- α em placentas de termo, em gestantes normais e com pré-eclâmpsia, detectaram por imunohistoquímica, coloração aumentada para TNF- α , enquanto havia deficiência de produção de IL-10 na placenta de gestantes com pré-eclâmpsia. Além disso, os níveis de IL-10 no soro de gestantes com esta patologia estavam diminuídos em comparação com gravidez normal. Segundo esses autores, a menor produção de IL-10 na placenta poderia estar relacionada ao desenvolvimento inadequado da placenta nessa patologia.

Por outro lado, Gratacós et al.⁽⁶²⁾, ao avaliarem os níveis séricos de IL-10, IL-4 e GM-CSF em gestantes normais e com pré-eclâmpsia, verificaram que as concentrações de IL-10 e IL-4 eram semelhantes em ambos os grupos. Recentemente, Ellis et al.⁽⁸⁰⁾ estudaram níveis plasmáticos de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α em gestantes com pré-eclâmpsia e verificaram níveis mais elevados de IL-6 e IL-8, enquanto os de TNF- α e IL-10 não se encontravam significativamente alterados, em comparação com gestantes normais.

Sabendo-se que na gestação existe um estado inflamatório fisiológico, e que a IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória, esse aumento durante a gestação pode ter ocorrido, na tentativa de regular a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α . A IL-10 apresenta papel regulador sobre a função de monócitos/macrófagos e neutrófilos, sendo considerada uma citocina supressora e potente agente anti-inflamatório. Além disso, essa citocina pode exercer efeito supressor sobre células NK e sobre a produção autócrina de TNF- α e IL-12 por monócitos. Muitos experimentos *in vitro* têm confirmado o papel anti-inflamatório da IL-10, enquanto que algumas situações *in vivo* sugerem que a IL-10 atue como citocina estimulatória^(81,82). Este paradoxo entre papel supressor ou estimulatório da IL-10 é discutido por Adib-Conquy et al.⁽⁸²⁾, que observaram ambas atividades, dependendo do tipo de estímulo fornecido à célula e do estado de estimulação em que esta se encontra.

A produção de IL-10 por monócitos/macrófagos pode ser inibida pela própria IL-10, uma vez que a secreção desta citocina parece ser auto-limitada e sua produção pode ocorrer relativamente mais tarde em relação às outras

citocinas produzidas pelos monócitos ⁽⁸³⁾. Assim, os monócitos/macrófagos secretam quantidades elevadas de citocinas pró-inflamatórias, antes de ocorrer produção e/ou inibição pela IL-10.

Nas gestantes normais e nas com pré-eclâmpsia deste estudo, os níveis endógenos elevados e semelhantes de IL-10, sugerem um mecanismo de controle da produção de TNF- α por essas células, submetidas à estimulação crônica durante a gestação, na tentativa de controle da reação inflamatória materna.

Neste trabalho, os níveis de TGF- β 1 produzidos por monócitos, após estímulo com LPS, foram significativamente mais elevados apenas o grupo de mulheres normais (Tabela 4). Nos grupos de gestantes normais e com pré-eclâmpsia a produção de TGF- β 1 pelos monócitos, após estímulo com LPS, mostrou níveis semelhantes aos endógenos da citocina, não havendo diferença significativa entre os valores obtidos antes e após estímulo com LPS (Figura 3). Esses resultados sugerem que as células de ambos os grupos de gestantes já se encontravam ativadas *in vivo*, não sendo estimuladas *in vitro* quando do cultivo com LPS.

A produção endógena elevada de TGF- β 1 e das demais citocinas, por monócitos de gestantes normais e com pré-eclâmpsia, parece refletir o estado inflamatório dessas células durante a gestação.

Não existem na literatura trabalhos estudando a produção de TGF- β 1 por monócitos, tanto na gravidez normal como na pré-eclâmpsia.

Djurovic et al. ⁽⁶⁶⁾ avaliando os níveis plasmáticos de TGF- β 1 em gestantes com pré-eclâmpsia, observaram valores significativamente mais elevados nessas

pacientes, não havendo correlação com a gravidade da patologia. Em trabalho recente, Lyall et al.⁽⁸⁴⁾ detectaram, por técnica de imunohistoquímica, a expressão semelhante das três isoformas de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 na placenta tanto de gestantes normais como das com pré-eclâmpsia, no terceiro trimestre da gestação. Os autores sugeriram que essa citocina parece não desempenhar papel importante na fisiopatologia da pré-eclâmpsia ou da restrição de crescimento intra-uterino.

Em vista dessas evidências e dos poucos trabalhos estudando essa citocina na literatura, fica difícil a interpretação dos resultados de produção de TGF- β 1 pelos monócitos, no presente trabalho. A semelhança dos resultados de TGF- β 1 obtidos em gestantes normais e nas com pré-eclâmpsia, sugere que, assim como a IL-10, o TGF- β 1 poderia estar desempenhando papel anti-inflamatório. Essa molécula poderia estar regulando o estado de ativação dos monócitos na gestação, uma vez que atua localmente como modulador tanto autócrino como parácrino⁽⁸⁵⁾.

O estudo da atividade fungicida contra *C.albicans* mostrou que, em gestantes normais e com pré-eclâmpsia, houve tendência a valores mais baixos desse parâmetro em relação às mulheres normais, embora não tenha sido observada diferença significativa entre os três grupos estudados (Tabela 4). Esses resultados sugerem que durante a gestação, os monócitos podem apresentar atividade fungicida ligeiramente diminuída, devido a produção de altos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β 1. Na pré-eclâmpsia, a avaliação de níveis plasmáticos de TNF- α , IFN- γ e IL-6 e da atividade microbicida de

monócitos, mostrou valores significativamente elevados de TNF- α tanto em gestantes normais como nas com pré-eclâmpsia, enquanto as funções fagocitária e microbicida estavam deprimidas nesses dois grupos⁽⁸⁶⁾. Roilides et al.⁽⁸⁷⁾ demonstraram efeito supressor de IL-10 sobre a função de monócitos humanos, desafiados com *C.albicans* e *Staphylococcus aureus*. Verificaram que a incubação prévia dessas células com IL-10 diminuía a capacidade fungicida e microbicida e suprimia a produção de anion superóxido, em resposta a estímulos como PMA.

O ensaio *in vitro* para detectar a liberação de H₂O₂ por monócitos em mulheres normais, gestantes normais e com pré-eclâmpsia, demonstrou que os níveis basais desse metabólito, detectados nas culturas não tratadas com PMA, foram semelhantes nos três grupos estudados. Entretanto, após estímulo com PMA, ativador direto da proteína quinase C, observaram-se níveis significativamente mais elevados nas gestantes normais em comparação com mulheres normais e com gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (Tabela 4). Esses resultados sugerem maior capacidade de produção de H₂O₂ por monócitos de gestantes normais e está de acordo com os resultados de trabalhos anteriores, demonstrando que essas células se encontram ativadas durante a gestação^(25,71). A detecção de reativos intermediários do oxigênio (H₂O₂, O₂⁻ e OH⁺) intracelulares por citometria de fluxo, em leucócitos de sangue periférico de gestantes normais e com pré-eclâmpsia, mostrou que essas células produzem esses metabólitos como parte do mecanismo imune de defesa⁽²⁵⁾.

A produção elevada de H₂O₂ por monócitos, estimulados com PMA, na gestação normal, sugere que essa atividade não está sendo regulada por

citocinas com atividade anti-inflamatória como IL -10 e TGF- β 1. Apesar dos níveis endógenos dessas citocinas se encontrarem elevados, não parecem ter efeito direto sobre a produção de H₂O₂ pelos monócitos.

A menor liberação desse metabólito por células de gestantes com pré-eclâmpsia, está em acordo com a menor capacidade de produção de TNF- α , observada quando essas células são estimuladas *in vitro* com LPS e, poderia refletir os efeitos crônicos da ativação mais acentuada dessas células, causada pelo estresse oxidativo, responsável pela patogênese da pré-eclâmpsia ⁽⁸⁸⁾. Segundo Walker ⁽⁸⁹⁾, em placentas de gestantes com pré-eclâmpsia, ocorre aumento da produção de TNF- α e de peróxidos lipídicos, causando redução de fatores anti-oxidantes. A peroxidação lipídica está também aumentada no sangue periférico em associação com citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-8, originadas de monócitos. Assim, na pré-eclâmpsia há um desbalanço entre atividade oxidante e anti-oxidante, que poderia afetar a atividade funcional dos monócitos.

Em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que tanto na gestação normal como na pré-eclâmpsia, os monócitos se encontram ativados *in vivo* e são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e anti-inflamatórias (IL -10 e TGF- β 1). A produção de citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- β 1, parece refletir a tentativa do organismo materno em modular a resposta imune sistêmica, que ocorre durante a gestação, no sentido de promover a defesa do organismo materno e ao mesmo tempo garantir o sucesso da gestação.

6. CONCLUSÕES

- Monócitos de gestantes normais e com pré-eclâmpsia estão ativados *in vivo*, produzindo níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β 1).
- Em gestantes com pré-eclâmpsia existe menor capacidade de produção de TNF- α e H₂O₂, após estímulo dos monócitos *in vitro*, quando comparadas com gestantes normais.
- Níveis elevados de IL-10 e TGF- β 1 sugerem a presença de um mecanismo de controle da reação inflamatória durante a gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 - Faas MM, Schuiling GA. Pre-eclampsia and the inflammatory response. *Eur J Obstet Gynecol* 2001; 95:213-7.
- 2 - Williams MA, Zingheim RW, King IB, Zebelman AM. Omega-3 fatty acids in maternal erythrocytes and risk of preeclampsia. *Epidemiology* 1995; 6:232-37.
- 3 - Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1359-75.
- 4 - Beer AE, Need JA. Immunological aspects of preeclampsia/eclampsia. *Birth Defects* 1985; 21:131-54.
- 5 - Sibai BM. Immunologic aspects of preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 1991; 34:27-34.
- 6 - Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14:353-6.
- 7 - Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor- α is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994 (a); 170:1752-7.
- 8 - Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Tamura RK, Rehnberg KA, Socol ML. Immunoreactive tumor necrosis factor-alpha is elevated in maternal plasma but undetected in amniotic fluid in the second trimester. *Am J Obstet Gynecol* 1994 (b); 171:976-9.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997; 126:36-47.

- 9 - Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CWG. Interleukin-6, tumor necrosis factor and soluble tumor necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Brit J Obstet Gynaecol* 1995; 102:20-5.
- 10 - Hill JA. Cytokines considered critical in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28:123-6.
- 11 - Chen HL, Yang YP, Hu XL, Yelavarthi KK, Fishback JL, Hunt JS. Tumor necrosis factor- α mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am J Pathol* 1991; 139:327-35.
- 12 - Hofmann GE, Horowitz GM, Scott RT Jr, Navot D. Transforming growth factor α in human implantation trophoblast: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:781-5.
- 13 - Jokhi PP, Chumbley G, King A, Gardner L, Loke YW. Expression of the colony stimulating factor 1 receptor (c-fms product) by cells at the human uteroplacental interface. *Lab Invest* 1993; 68:308-20.
- 14 - Simon C, Frances A, Piquette G, Hendrickson M, Milki A, Polan ML. Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/ paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:847-54.
- 15 - Hara N, Fujii T, Okai T, Taketani Y. Histochemical demonstration of interleukin-2 in decidua cells of patients with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1995, 34:44-51.
- 16 - Lysiak JJ, Hunt J, Pringle GA, Lala PK. Localization of transforming growth factor β and its natural inhibitor decorin in the human placenta and decidua throughout gestation. *Placenta* 1995; 16:221-31.
- 17 - Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40:102-11.

- 18 - Redman CWG. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 1991; 12:301-8.
- 19 - Redman CWG, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:499-506.
- 20 - Boyd PA, Lindenbaum RH, Redman CWG. Pre-eclampsia and trisomy 13: a possible association. *Lancet* 1987; 2:425-7.
- 21 - Tuohy JF, James DK. Pre-eclampsia and trisomy 13. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99:891-4.
- 22 - Oian P, Omsjo I, Maltau JM, Osterud B. Increased sensitivity to thromboplastin synthesis in blood monocytes from pre-eclamptic patients. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92:511-7.
- 23 - Haeger M, Unander M, Norder-Hansson B, Tylman M, Bengtsson A. Complement, neutrophil, and macrophage activation in women with severe preeclampsia and the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol* 1992; 79:19-26.
- 24 - Haeger M, Unander M, Andersson B, Tarkowski A, Arnestad JP, Bengtsson A. Increased release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in women with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75:695-701.
- 25 - Sacks GP, Studena K, Sargent IL, Redman CWG. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:80-6.
- 26 - Schröcksnadel H, Fuchs D, Herold M, Wachter H, Dapunt O. Activated macrophages in the pathologic mechanism of pregnancy-induced hypertension. *Zentralbl Gynakol* 1992; 116:274-5.
- 27 - Schröcksnadel H, Herold M, Steckel-Berger G, Fuchs D, Wachter H, Dapunt O. Cell-mediated immunity in hypertensive disorders of pregnancy. *Geburtshilfe Frauenheilk* 1994; 52:592-5.

- 28 - Moonis M, Ahmad I, Bochhowot BW. Macrophages in host defence – an overview. *Indian J Biochem Biophys* 1992; 29:115-22.
- 29 - Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and microbial activity. *J Exp Med* 1983; 158:670-89.
- 30 - Hoffman M, Weinberg JR. Tumor necrosis factor–alpha induces increased hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not increased an antigen expression by peritoneal macrophages. *J Leukocyte Biol* 1987; 42:704-10.
- 31 - Reed SV, Nathan CF, Pihl DL, Rodricks P, Schaneback K, Conilon PJ. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* with interferon. *J Exp Med* 1987; 166:1743-9.
- 32 - Evans R. Specific and non-specific activation of macrophages. In: Wagner WR, Habin H. Activation of macrophages. Amsterdam: Exc. Medica 1974, p.305.
- 33 - Mackenness GB. The immunological basis of adquired cellular resistance. *J Exp Med* 1964; 120:105-10.
- 34 - Karnovsky ML, Lazding JK. Biochemical criteria for activated macrophages. *J Immunol* 1978; 121:809-13.
- 35 - Mackenness GB, Blander RV. Cellular immunity. *Prog Allergy* 1967; 11:89-91.
- 36 - Rabinovitch M. Macrophages spreading *in vitro*. In: Mononuclear phagocytes, characteristics, physiology & function. Oxford: Van Furth, 1975.
- 37 - Abbas AK, Lihtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology, 2nd. ed. W B Saunders Company, Philadelphia, Pensylvania, 1994, 457p.

- 38 - Hamblin AS. Cytokines and cytokine receptors. Oxford University Press, 1993, 90p.
- 39 - Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. Eur Resp J 1994; 7:1678-89.
- 40 - Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . Nature 1988; 334:260-2.
- 41 - Oswald IP, Gazzinelli RT, James SL. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. J Immunol, 1992; 148:3578-82.
- 42 - Bogdan C, Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor β , interleukin-4, and interleukin-10. Ann N Y Acad Sci 1993; 23:713-39.
- 43 - Champs J, Young LS, Bermudez LE. Production of TNF- α , IL-6 and TGF- β , and expression of receptors for TNF- α and IL-6, during murine *Mycobacterium avium*. Infect Immun 1995; 84:549-54.
- 44 - Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: a cause and a cure. J Clin Immunol 1992; 12:61-74.
- 45 - Nunes I, Shapiro RL, Rifkin DB. Characterization of latent TGF- β activation by murine peritoneal macrophages. J Immunol 1995; 155:1450-9.
- 46 - Ding AC, Nathan J, Graycar R, Derynck DJ, Stuehr S, Srinivasan S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β 1, β 2 and β 3 inhibit of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . J Immunol 1990; 145:940-4.
- 47 - Chantry D, Turner M, Abdely E, Feldman M. Modulation of cytokine production by transformation growth factor- β . J Immunol 1989; 142:4295-300.

- 48 - Greer IA, Lyall F, Perera T, Boswell F, Macara LM. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet Gynecol* 1994; 84:937-40.
- 49 - Schiff E, Friedman SA, Baumann P, Sibai BM, Romero R. Tumor necrosis- α in pregnancies associated with preeclampsia or small-for-gestational-age newborns. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:1224-9.
- 50 - Opsjon SL, Austgulen R, Waage A. Interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor at delivery in preeclamptic disorders. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995 (a); 74:19-26.
- 51 - Opsjon SL, Novick D, Wathen NC, Cope AP, Wallach D, Aderka D. Soluble tumor necrosis factor receptors and soluble interleukin-6 receptor in fetal and maternal sera, coelomic and amniotic fluids in normal and pre-eclamptic pregnancies. *J Reprod Immunol* 1995 (b); 29:119-34.
- 52 - Eneroth E, Remberger M, Vahlne A, Ringden O. Increased serum concentrations of interleukin-2 receptor in the first trimester in women who later developed severe preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:591-3.
- 53 - Heyl W, Handt S, Reister F, Gahlen J, Schröder W, Mittermayer C, et al. Elevated soluble molecules in women with pre-eclampsia. Do cytokines like tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β cause endothelial activation? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 86:35-41.
- 54 - Livingston JC, Park V, Barton JR, Elfering S, Haddad B, Mabie WC et al. Lack of association of severe preeclampsia with maternal and fetal mutant alleles for tumor necrosis factor α and lymphotoxin α genes and plasma tumor necrosis factor α levels. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1273-7.
- 55 - Kupferminc MJ, Peaceman AM, Aderka D, Wallach D, Socol M.L. Soluble tumor necrosis factor receptors and interleukin-6 levels in patients with severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1996; 88:420-7.

- 56 - Meekins JW, McLaughlin PJ, West DC, McFadyen IR, Johnson PM. Endothelial cell activation by tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the development of preeclampsia. *Clin Exp Immunol* 1994; 98:110-14.
- 57 - Visser W, Beckmann I, Bremer HA, Lim HL, Wallenburg HCS. Bioactive tumor necrosis factor α in pre-eclamptic patients with and without the HELLP syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101:1081-2 .
- 58 - Xu W, Yang Q, Chen H. Tumor necrosis factor in pregnancies associated with pregnancy induced hypertension. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1997; 32:9-11.
- 59 - Omu AE, Al-Qattan F, Diejomaoh ME, Al-Yatama M. Differential levels of T helper cytokines in preeclampsia: pregnancy, labor and puerperium. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78:675-80.
- 60 - Benyo DF, Smarason A, Redman CWG, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2505-12.
- 61 - Peraçoli JC. Fator de necrose tumoral- α detectado no plasma e produzido por monócitos de gestantes com hipertensão induzida pela gestação e pré-eclâmpsia. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP – 2000, 96p.
- 62 - Gratacós E, Filella X, Palacio M, Cararach V, Alonso PL, Fortuny A. Interleukin-4, interleukin-10, and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in second-trimester serum from women with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1998; 92:849-53.
- 63 - Rinehart BR, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin Jr JN et al. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor α , interleukin 1 β , and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:915-20.

- 64 - Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol* 1999; 163:3491-5.
- 65- Vizi ES, Szelenyi J, Selmeczy Z, Papp Z, Nemeth ZH, Hasko G et al. Enhanced tumor necrosis factor-alpha-specific and decreased interleukin-10-specific immune responses to LPS during the third trimester of pregnancy in mice. *J Endocrinol* 2001; 171:355-61.
- 66 - Djurovic S, Schjetlein R, Wisloff F, Haugen G, Husby H, Berg K. Plasma concentrations of Lp(a) lipoprotein and TGF-beta1 are altered in preeclampsia. *Clin Genet* 1997; 52:371-6.
- 67 - Boyüm A.. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Lab Clin Invest* 1968; 21:77-89.
- 68 - Pick A., Keisari A. A simple colorimetric method for measured of hydrogen peroxidase produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38: 161-72.
- 69 - Pick E, Mizel D. Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophage in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 1981; 46: 211-26.
- 70 - Godfrey KAM. Statistic in practice. Comparing the means of several groups. *N Engl J Med* 1985; 313:450-6.
- 71 - Sacks G, Sargent I, Redman CWG. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 1999; 20:114-8.
- 72 - Koumandakis E, Koumandaki I, Kaklamani E, Sparos L, Aravantinos D, Trichopoulos D. Enhanced phagocytosis of mononuclear phagocytes in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93:1150-4.

- 73 - Shibuya T, Izuchi K, Kuroiwa A, Okabe N, Shirakawa K. Study on nonspecific immunity in pregnant women: increased chemiluminescence response of peripheral blood phagocytes. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 15:19-23.
- 74 - Berge LN, Ostensen M, Revhaug A. Phagocytic cell activity in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988; 67:499-504.
- 75 - Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350:485-7.
- 76 - Knight M, Redman CWG, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:632-40.
- 77 - Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272:50-3.
- 78 - Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E. Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med* 1996; 128:594-600.
- 79 - Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C et al. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin-10 and transforming growth factor β . *J Exp Med* 1995; 181:1887-92.
- 80 - Ellis J, Wennerholm UB, Bengtsson A, Lilja H, Pettersson A, Sultan B et al. Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80:602-8.
- 81 - Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 56:1-26.

- 82 - Adib-Conquy M, Petit AF, Marie C, Fitting C, Cavailon JM. Paradoxal priming effects of IL-10 on cytokine production. *Int Immunol* 1999; 11:689-98.
- 83 - De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennet B, Figdor CG, Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209-20.
- 84 - Lyall F, Simpson H, Nicola BJ, Barber A, Courtenay RS. Transforming growth factor-beta expression in human placenta and placental bed in third trimester normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *Am J Pathol* 2001; 159:1827-38.
- 85 - Schilling B, Yeh J. Expression of transforming growth factor (TGF)- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3 and of type I and II TGF- β receptors during the development of the human fetal ovary. *Fertil Steril* 1999; 72:147-53.
- 86 - Munno I, Chiechi LM, Lacedra G, Berardesca C, Patimo C, Marcuccio L et al. Evaluation of nonspecific immunity and plasma levels of interferon-gamma, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in preeclampsia. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999; 21:551-64.
- 87 - Roilides E, Anastasiou-Katsiardani A, Dimitriadou-Georgiadou A, Kadiltsoglou I, Tsaparidou S, Panteliadis C et al. Suppressive effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1998; 178:1734-42.
- 88 - Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222:222-35.
- 89 - Walker JJ. Antioxidants and inflammatory cell response in preeclampsia. *Semin reprod Endocrinol* 1998; 16:47-55.

RESUMO

A Pré-eclâmpsia é uma complicação grave da gestação, caracterizada por hipertensão e proteinúria. Os sintomas desta síndrome aparecem durante a segunda metade da gestação. A literatura sugere que a pré-eclâmpsia resulta de uma resposta inflamatória excessiva à gestação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de monócitos de sangue periférico através da produção de citocinas, atividade fungicida e liberação de peróxido de hidrogênio por essas células em gestantes normais e com pré-eclâmpsia. Foram estudadas 25 mulheres não-grávidas e normotensas e 50 gestantes sendo 20 normotensas e 30 com pré-eclâmpsia. Monócitos foram cultivados com ou sem 10 ug/mL de lipopolissacáride (LPS) durante 24 h a 37°C e os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), de Interleucina-10 (IL-10) e de fator transformador do crescimento beta (TGF- β 1) foram determinados no sobrenadante de cultura por ensaio imunoenzimático. A atividade fungicida foi avaliada pela recuperação de células viáveis de *Candida albicans* após plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias em meio ágar Sabouraud. A liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinada antes e após estímulo dos monócitos com phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Os resultados mostraram que os níveis endógenos de TNF- α , IL-10 e de TGF- β 1 produzidos por monócitos, cultivados sem estímulo, foram significativamente mais elevados tanto em gestantes normais como nas com pré-eclâmpsia. Resultados semelhantes foram observados com relação à produção de IL-10 e TGF- β 1 por monócitos após estímulo com LPS. A liberação de H₂O₂ após estímulo com PMA foi mais elevada em gestantes normais do que nas com pré-eclâmpsia. Além disso, monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia produzem níveis mais baixos de TNF- α , sugerindo uma diminuição na capacidade de produção dessa citocina, após estímulo com LPS. A atividade fungicida foi semelhante nos três grupos estudados. Esses resultados mostram que monócitos circulantes de gestantes normais e com pré-eclâmpsia estão ativados *in vivo*, produzindo níveis elevados de citocinas pró e anti-inflamatórias. Em mulheres com pré-eclâmpsia há um defeito na capacidade de produção de TNF- α e H₂O₂ após estímulo dos monócitos *in vitro* em comparação com

gestantes normais. A produção elevada de IL-10 e de TGF- β 1 por monócitos, após estímulo com LPS, sugerem que essas citocinas anti-inflamatórias podem estar envolvidas na modulação da resposta inflamatória materna, durante a gestação.

ABSTRACT

Pre-eclampsia is a severe complication of pregnancy, characterized by hypertension and proteinuria. The symptoms of this syndrome appear during the second half of the pregnancy. The literature suggests that pre-eclampsia results from an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. The objective of this study was to evaluate the activity of peripheral blood monocytes by cytokine production, fungicidal activity and hydrogen peroxide liberation in normotensive pregnant women and with pre-eclampsia. The study included 25 normotensive non-pregnant and 50 pregnant women being 20 normotensive and 30 with pre-eclampsia. Monocytes from these women were cultivated with or without 10 ug/mL lipopolysaccharide (LPS) during 24h at 37°C, and the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) were determined in culture supernatants by enzyme immunoassay. The fungicidal activity was determined by the recovery of viable *Candida albicans* after co-culture of yeasts with monocyte and plating in Sabouraud medium with enumeration of colony forming units. Hydrogen peroxide (H₂O₂) liberation was determined before and after monocyte stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). The results showed that endogenous levels of TNF- α , IL-10 and TGF- β 1 detected in supernatants of monocytes cultivated without stimulus were significantly higher in both normal and pre-eclampsia pregnant patients than in non-pregnant women. Similar results were observed in relation to IL-10 and TGF- β 1 production after monocyte stimulation with LPS. Monocytes from normotensive pregnant women released higher levels of H₂O₂ after PMA stimulation than cells from patients with pre-eclampsia. Besides monocytes from women with pre-eclampsia produced lower levels of TNF- α suggesting an impairment in the capacity of this cytokine production after LPS stimulation. Fungicidal activity was similar between the three groups studied. These data showed that circulating monocytes from normal and pre-eclamptic pregnant patients are activated *in vivo* producing high levels of pro and anti-inflammatory cytokines. In pregnant women with pre-eclampsia there are an impaired ability of TNF- α and H₂O₂ production

after *in vitro* monocyte stimulation in comparison with normotensive pregnant women. The increased production of IL-10 and TGF- β 1 by monocytes after LPS stimulation suggest that these anti-inflammatory cytokines may be involved in the modulation of maternal inflammatory response during pregnancy.