



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

**Vanessa Rocha Ribeiro**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE PERFIL DE CITOCINAS E  
FATORES DE TRANSCRIÇÃO PRODUZIDOS POR  
SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T NA PRÉ-ECLÂMPSIA  
PRECOCE E TARDIA**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

**Botucatu  
2017**

**VANESSA ROCHA RIBEIRO**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE PERFIL DE CITOCINAS E  
FATORES DE TRANSCRIÇÃO PRODUZIDOS POR  
SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T NA PRÉ-ECLÂMPSIA  
PRECOCE E TARDIA**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Botucatu  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ribeiro, Vanessa Rocha.

Associação entre perfil de citocinas e fatores de transcrição produzidos por subpopulações de células T na pré-eclâmpsia precoce e tardia / Vanessa Rocha Ribeiro. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli  
Capes: 40101150

1. Células T. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Fatores de transcrição.  
4. Citocinas. 5. Subpopulações de linfócitos T.

Palavras-chave: Citocinas; Fatores de transcrição;  
Pré-eclâmpsia precoce; Pré-eclâmpsia tardia; Subpopulações de células T.

Trabalho realizado no laboratório Imunologia da Reprodução do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processos nº 2012/24697-8 e 2014/25124-7.



# *Dedicatória*

Dedico este trabalho aos meus pais.

Ao meu pai Nivaldo (*in memoriam*), que foi um exemplo de homem, de alegria de viver, de luta e de superação. Sempre se esforçou para me dar um estudo de qualidade, mesmo com todo seu problema de saúde, nunca deixou transpassar as dificuldades para mim. Eu sei o quanto ele sonhava com esse momento da minha vida, hoje apesar dele não estar presente, tenho certeza aonde ele se encontra, receberá todo o meu amor e retribuição por tudo que me ensinou. Obrigada Pai, meu amor eterno.

À minha mãe Leda, uma mulher guerreira, que hoje faz o papel de mãe e de pai. Meu exemplo de mulher, mãe e batalhadora. Não tenho palavras para descrever todo o meu agradecimento à ela, que sabe o quanto foi difícil essa caminhada e quantas vezes quis desistir, mas com todo seu apoio e incentivo consegui chegar até aqui. Obrigada por tudo que faz por mim, pelo amor, carinho, paciência e por sempre estar do meu lado. Obrigada Mãe, meu amor incondicional.

AMO MUITO VOCÊS!



# *Agradecimentos*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha orientadora Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por ter me dado à oportunidade de conhecer o seu laboratório e desde então, pela confiança depositada em mim. Essa conquista só foi possível graças à sua orientação, incentivo, palavras de conforto, carinho, compreensão e por estar sempre disposta a ajudar. A sua dedicação à profissão é uma referência que levarei para a construção da minha carreira. Obrigada por ser mais que uma professora, ser como uma mãe nesses anos todos.

*“A felicidade aparece para aqueles que reconhecem  
a importância das pessoas que passam em nossa vida.”*

*Clarice Lispector*

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao meu irmão Junior, uma das pessoas mais importantes de minha vida, agradeço por todos os conselhos, preocupações e por fazer de tudo para me proteger e me deixar feliz sempre. Eu te amo demais.

Ao meu namorado Caio, agradeço por ter entrado em minha vida e também por ser esse namorado especial, que me apoia nas horas difíceis, pelos momentos de alegria que compartilhamos e por me fazer acreditar que posso mais que imagino. Obrigada por ter feito do meu sonho, o nosso sonho. Te amo muito.

Aos meus familiares Ribeiro e Rocha, que mesmo distantes, vibram e se orgulham de minhas conquistas.

Aos meus sogros José Carlos e Márcia, pelo incentivo e por me acolherem em sua família com tanto carinho.

Às minhas amigas do Lab 03, Má, Mazinha e Pri, pelo companheirismo, pelas ajudas e acima de tudo pela nossa forte amizade. Sem vocês esse trabalho não seria completo.

Ao Professor Ramon, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, que disponibilizou o seu laboratório e a Dr<sup>a</sup> Graziela, por me auxiliar na elaboração de uma parte fundamental do meu trabalho e por destinar o seu tempo para participar desta pesquisa.

À minha amiga Camila, que através dela, conheci a Prof<sup>a</sup> Terezinha e consegui realizar o sonho de entrar na pós-graduação.

À minha amiga Thais, pela nossa amizade que só se fortalece com o tempo. Hoje tenho mais que uma amiga, uma irmã de coração.

Às minhas amigas da graduação Carol e Ana Júlia, que juntas sonhávamos com a nossa trajetória pós-formadas.

À todos os docentes, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por toda a ajuda e pela boa convivência.

Ao Dr. Peraçoli, a Dr<sup>a</sup>. Vera e ao Dr. Leandro e aos demais docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela cuidadosa seleção das pacientes e por sempre estarem disponíveis a me ajudar.

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

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

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

Ao programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, por possibilitar a realização deste trabalho e aos funcionários (principalmente à Solange) pela disponibilidade, simpatia, gentileza e eficiência em todas as necessidades.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro para realização deste projeto. Processos nº 2012/24697-8 e 2014/25124-7.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho e que principalmente contribuíram para a minha formação.

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais”.*

*Augusto Cury*



# *Sumário*

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos .....	26
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Casuística.....	27
3.2 Critérios de inclusão .....	27
3.3 Critérios de não-inclusão .....	28
3.4 Dosagem de proteinúria.....	28
3.5 Colheita de sangue e separação do plasma .....	28
3.6 Isolamento e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) 28	
3.7 Análise da expressão dos fatores de transcrição em linfócitos T pela técnica de citometria de fluxo .....	29
3.7.1 Estratégia de análise fenotípica dos linfócitos por citometria de fluxo.....	30
3.7.2 Estratégia de análise para perfis Th1, Th2 e Th17 de linfócitos por citometria de fluxo.....	30
3.7.3 Estratégia de análise para perfil Treg de linfócitos por citometria de fluxo .....	31
3.8 Avaliação da expressão dos transcritos relacionados aos fatores de transcrição respectivo de cada subpopulação pela técnica de RT-qPCR .....	32
3.8.1 Padronização da escolha do normalizador utilizado na técnica de RT-qPCR ....	33
3.9 Detecção das citocinas relacionadas às subpopulações Th1,Th2,Th17 e Treg pela técnica de ELISA .....	35
3.10 Análise Estatística .....	36
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 Características dos grupos estudados .....	36

4.2	Expressão de fatores de transcrição em subpopulações de linfócitos pela técnica de citometria de fluxo .....	37
4.3	Expressão de fatores de transcrição em subpopulações de linfócitos pela técnica de RT-qPCR.....	41
4.4	Determinação das citocinas relacionadas as subpopulações de células T pela técnica de ELISA.....	43
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
	<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>64</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>100</b>
8.1	Anexo 1 .....	100
8.2	Anexo 2 .....	101
8.3	Anexo 3 .....	102



# *Capítulo 1*

*“A possibilidade de realizarmos um sonho  
é o que torna a vida interessante.”*

*Paulo Coelho*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**APC:** fluorocromo alofocianina

**APC-Cy7:** fluorocromo alofocianina conjugado com cianina 7

**BB515:** fluorocromo azul brilhante 515

**cDNA:** DNA complementar

**CD:** *cluster of differentiation*

**CD3:** *cluster of differentiation 3*, molécula marcadora de células T

**CD4:** *cluster of differentiation 4*, molécula marcadora de células T *helper*

**CD25:** *cluster of differentiation 25*, molécula marcadora de células T reguladoras

**CD127:** *cluster of differentiation 127*, molécula marcadora de células T reguladoras

**CTLA-4:** antígeno 4 de linfócito T citotóxico

**CXCL10/IP-10:** *C-X-C motif chemokine ligand 10*, quimiocina

**EDTA:** ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA:** ensaio de imunoabsorção enzimática

**FoxP3:** *forkhead box P3*, fator de transcrição de células T reguladoras

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

**FSC-A:** *forward scatter-área*

**FSC-H:** *forward scatter-altura*

**GAPDH:** gliceraldeído 3-fosfato- desidrogenase

**GATA-3:** *GATA binding protein 3*, fator de transcrição de células Th2

**HIV:** vírus da imunodeficiência humana

**Hsp:** proteína de choque térmico

**IFN- $\gamma$ :** interferon gama

**IL:** interleucina

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

**MIF:** média de intensidade de fluorescência

**NF-κB:** fator nuclear kappa B

**PE:** fluorocromo ficoeritrina

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

**PE-Cy7:** fluorocromo ficoeritrina conjugado com corante cianina

**RORc:** *retinoic acid-related orphan receptor C*

**rpm:** rotações por minuto

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

**RT-qPCR:** reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

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

**SSC-A:** *side scatter-área*

**T-bet:** *T box transcription factor*, fator de transcrição de células Th1

**TGF-β1:** fator transformador do crescimento beta 1

**Th1:** célula T helper 1

**Th2:** célula T helper 2

**Th17:** célula T helper 17

**TNF-α:** fator de necrose tumoral alfa

**Treg:** célula T reguladora

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

**mg:** miligramas

**mL:** mililitro

**mm:** milímetro

**pg:** picograma

**U/mL:** unidade por mL

**µg:** micrograma

**µL:** microlitro

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferenciação de células T naive, em fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg .....	25
<b>Figura 2.</b> Estratégia de análise fenotípica dos linfócitos por citometria de fluxo .....	31
<b>Figura 3.</b> Estratégia de análise fenotípica dos linfócitos. <b>(A)</b> gates de linfócitos. <b>(B)</b> T-bet (Th1). <b>(C)</b> GATA-3 (Th2). <b>(D)</b> RORc (Th17) .....	32
<b>Figura 4.</b> Estratégia de análise fenotípica dos linfócitos T reguladores .....	33
<b>Figura 5.</b> Representação gráfica das curvas de amplificação da expressão gênica de $\beta$ -actina <b>(A)</b> e GAPDH <b>(B)</b> .....	35
<b>Figura 6.</b> Representação gráfica da curva de dissociação da $\beta$ -actina <b>(A)</b> e GAPDH <b>(B)</b> .....	36
<b>Figura 7.</b> Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de intensidade de fluorescência (MIF) em gestantes com PE e normotensas. <b>(A)</b> % T-bet. <b>(B)</b> MIF T-bet. <b>(C)</b> % RORc. <b>(D)</b> MIF RORc .....	39
<b>Figura 8.</b> Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de intensidade de fluorescência (MIF) em gestantes com PE e normotensas. <b>(A)</b> % GATA-3. <b>(B)</b> MIF GATA-3. <b>(C)</b> % FoxP3. <b>(D)</b> MIF FoxP3 .....	40
<b>Figura 9.</b> Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de intensidade de fluorescência (MIF) em gestantes portadoras de PE precoce e tardia e normotensas com idade gestacional correspondente. <b>(A)</b> % T-bet. <b>(B)</b> MIF T-bet. <b>(C)</b> % RORc. <b>(D)</b> MIF RORc .....	41
<b>Figura 10.</b> Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de intensidade de fluorescência (MIF) em gestantes portadoras de PE precoce e tardia e normotensas com idade gestacional correspondente. <b>(A)</b> % GATA-3. <b>(B)</b> MIF GATA-3. <b>(C)</b> % FoxP3. <b>(D)</b> MIF FoxP3 .....	42
<b>Figura 11.</b> Expressão gênica dos fatores de transcrição de perfis inflamatórios .....	43
<b>Figura 12.</b> Expressão gênica dos fatores de transcrição de perfis anti-inflamatórios ....	44
<b>Figura 13.</b> Expressão proteica das citocinas IFN- $\gamma$ <b>(A)</b> , TNF- $\alpha$ <b>(B)</b> , IL-6 <b>(C)</b> , IL-17 <b>(D)</b> e IL-22 <b>(E)</b> .....	45
<b>Figura 14.</b> Expressão proteica das citocinas IL-4 <b>(A)</b> , IL-10 <b>(B)</b> e TGF- $\beta$ 1 <b>(C)</b> .....	46

## RESUMO

**Introdução:** A pré-eclâmpsia (PE) é uma patologia obstétrica e uma das principais causas de morbimortalidade materna e fetal. Na PE ocorre um estado de má adaptação da tolerância imunológica, caracterizada por ativação anormal do sistema imune inato e adaptativo. As células T reguladoras (Treg) representam uma população de linfócitos T responsáveis pela manutenção da tolerância e controle da inflamação, enquanto células Th17 medeiam diferentes tipos de reações inflamatórias. Portanto, o balanço entre células Treg e Th17 pode ser crítico para a tolerância ao feto e prevenção da PE. **Objetivo:** Avaliar as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 e Treg) e o perfil de citocinas produzido por essas células, em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, classificadas em PE precoce e PE tardia. **Métodos:** Foram estudadas 60 gestantes, sendo 20 normotensas e 40 portadoras de PE, pareadas pela idade gestacional. As gestantes com PE foram classificadas de acordo com o aparecimento das manifestações clínicas em PE precoce (< 34 semanas de gestação; n=20) e PE tardia (≥ 34 semanas de gestação; n=20). Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), obtidas das gestantes foram avaliadas quanto à produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e à expressão de fatores de transcrição envolvidos na caracterização das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>. A expressão dos fatores de transcrição intracitoplasmáticos de células Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3), Th17 (RORc) e Treg (FoxP3) foi avaliada por citometria de fluxo e a expressão gênica desses fatores de transcrição foi determinada por PCR em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR), logo após a colheita de sangue para avaliação da expressão endógena dessas diferentes subpopulações de células T. A determinação das citocinas de perfil Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-6, IL-17 e IL-22) e Treg (IL-10 e TGF- $\beta$ 1) foi realizada no plasma das gestantes pela técnica de ELISA. Os resultados foram analisados por meio de testes paramétricos ou não paramétricos com nível de significância de 5%. **Resultados:** Os perfis inflamatórios Th1 e Th17 foram identificados por aumento significativo da média de intensidade de fluorescência (MIF) e da percentagem de células expressando os fatores de transcrição específicos nas gestantes portadoras de PE precoce e PE tardia em relação aos grupos de gestantes normotensas com idade gestacional correspondente. A percentagem de células Th17 foi significativamente maior nas gestantes com PE

precoce do que nas com PE tardia. Por outro lado, a análise dos perfis anti-inflamatórios Th2 e Treg mostrou que a percentagem de células expressando GATA-3 e FoxP3 foi significativamente menor nos grupos de PE precoce e PE tardia comparados aos grupos de normotensas, enquanto a comparação entre gestantes pré-eclâmpticas mostrou percentagem de células Treg significativamente menor nas gestantes portadoras de PE precoce. A expressão gênica do fator de transcrição T-bet por PBMCs não mostrou diferenças significativas entre os grupos de gestantes pré-eclâmpticas e de normotensas. Aumento significativo da expressão gênica do fator de transcrição RORc e diminuição da expressão dos genes GATA-3 e FoxP3 foram observados nos grupos de gestantes pré-eclâmpticas em relação aos grupos de normotensas de idade gestacional correspondente. Entre as gestantes pré-eclâmpticas, encontrou-se menor nível transcricional do fator de transcrição GATA-3 na PE precoce. Os níveis plasmáticos das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 e TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores nas gestantes portadoras de PE, enquanto as concentrações de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 foram significativamente menores em comparação aos grupos de gestantes normotensas correspondentes. Observaram-se ainda, maiores níveis de IL-6, IL-17, TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$  na PE precoce do que na PE tardia. A expressão proteica de IL-4 (perfil Th2) e IL-22 (perfil Th17), não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. **Conclusão:** Os resultados demonstram que o balanço entre células Treg e Th17 é deficiente na PE, havendo polarização para perfil Th17 na PE precoce. Esse desbalanço pode ser atribuído ao predomínio de citocinas pró-inflamatórias sobre as anti-inflamatórias, presentes na circulação de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

**Palavras-chave:** citocinas, fatores de transcrição, pré-eclâmpsia precoce, pré-eclâmpsia tardia, subpopulações de células T.

## ABSTRACT

**Introduction:** Preeclampsia (PE) is an obstetric pathology and one of the main causes of maternal and fetal morbidity and mortality. In PE there is a state of maladaptation of immunological tolerance, characterized by abnormal activation of the innate and adaptive immune system. Regulatory T cells (Treg) represent a population of T lymphocytes responsible for tolerance maintenance and inflammation control, whereas Th17 cells mediate different types of inflammatory reactions. Therefore, the balance between Treg and Th17 cells may be critical for fetal tolerance and PE prevention. **Objective:** To evaluate the subpopulations of CD4<sup>+</sup> T cells (Th1, Th2, Th17 and Treg) and the cytokine profile produced by these cells in pregnant women with PE, classified in early-onset PE and late-onset PE. **Methods:** Sixty pregnant women, 20 normotensive and 40 preeclamptic women, matched by gestational age, were studied. Pregnant women with PE were classified according to clinical manifestations in early-onset PE (<34 weeks gestation; n = 20) and late-onset PE (≥ 34 weeks gestation; n = 20). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from pregnant women were evaluated for the production of pro and anti-inflammatory cytokines and expression of transcription factors involved in the characterization of CD4<sup>+</sup> T cell subpopulations. Expression of the intracytoplasmic transcription factors of Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3), Th17 (RORc) and Treg (FoxP3) cells was assessed by flow cytometry and the gene expression of these transcription factors was determined by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) shortly after blood collection to evaluate the endogenous expression of these different T-cell subpopulations. The cytokine profile of Th1 cells (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL -4), Th17 (IL-6, IL-17 and IL-22) and Treg (IL-10 and TGF- $\beta$ 1) were measured in the plasma of the pregnant women by the ELISA. The results were analyzed using parametric or non-parametric tests with a significance level of 5%. **Results:** Th1 and Th17 inflammatory profiles were identified by a significant increase in mean fluorescence intensity (FMI) and by the percentage of cells expressing specific transcription factors in pregnant women with early-onset PE and late-onset PE in relation to the normotensive groups with corresponding gestational age. The percentage of Th17 cells was significantly higher in early-onset PE than in late-onset PE group. On the other hand, analysis of Th2 and Treg anti-inflammatory profiles showed percentages of cells expressing GATA-3 and FoxP3

significantly lower in the early- and late-onset PE groups compared to the normotensive groups, whereas the comparison between preeclamptic groups showed significantly lower percentage of Treg cells in pregnant women with early-onset PE. The gene expression of the T-bet transcription factor by PBMCs did not show significant differences between the preeclamptic and normotensive pregnant groups. Significant increase in the gene expression of RORc and decrease in the expression of the GATA-3 and FoxP3 genes were observed in both groups of preeclamptic women compared with the normotensive ones of corresponding gestational age. Among the preeclamptic pregnant women lower transcriptional level of GATA-3 transcription factor was detected in early-onset PE. Plasma levels of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 and TNF- $\alpha$  were significantly higher in pregnant women with PE, whereas IL-10 and TGF- $\beta$ 1 concentrations were significantly lower than in the normotensive corresponding groups. It was also observed higher levels of IL-6, IL-17, TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  in early-onset than in late-onset PE group. Protein expression of IL-4 (Th2 profile) and IL-22 (Th17 profile), did not show significant differences between the groups studied. **Conclusion:** The results show that the balance between Treg and Th17 cells is deficient in PE, with polarization to the Th17 profile in early-onset PE. This imbalance can be attributed to the predominance of pro-inflammatory cytokines over the anti-inflammatory ones present in the circulation of pregnant women with preeclampsia.

**Keywords:** cytokines, early-onset preeclampsia, late-onset preeclampsia, T cell subsets, transcription factors.

## 1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez humana que incide entre 3% e 8% das gestações (Carty et al., 2010; Uzan et al., 2011), sendo considerada a principal causa de morbimortalidade materna e fetal, especialmente nos países em desenvolvimento (Sibai et al., 2005; Duley, 2009). É uma doença sistêmica, caracterizada por múltiplas alterações no organismo materno (Wegmann et al., 1993) e clinicamente identificada pela manifestação de hipertensão arterial e proteinúria a partir da 20<sup>a</sup>. semana de gestação (NHBPEP, 2000). Outras disfunções maternas também estão relacionadas com PE, como insuficiência renal, envolvimento hepático, complicações neurológicas ou hematológicas, disfunção útero-placentária ou restrição de crescimento fetal (Tranquilli et al., 2014; Mol et al., 2016).

Embora a PE seja uma doença ainda sem etiologia claramente definida, está demonstrado que sua fisiopatologia é influenciada diretamente pela placenta (Robillard, 2002; Redman & Sargent, 2005). A literatura sugere a interação de vários mecanismos na caracterização multisistêmica da doença, tais como placentação inadequada (Pijnenborg et al., 1983), disfunção endotelial (Khan et al., 2005), má adaptação imunológica (Dekker & Sibai, 1999), estresse oxidativo (Gupta et al., 2005; Redman & Sargent, 2000; 2005) e resposta inflamatória excessiva (Redman et al., 1999; Redman & Sargent, 2003).

A PE é classificada em leve e grave, de acordo com manifestações clínicas e laboratoriais (ACOG, 2002) e em PE precoce ou tardia, na dependência do aparecimento das manifestações clínicas antes da 34<sup>a</sup> ou a partir da 34<sup>a</sup> semana de gestação, respectivamente (von Dadelszen et al., 2003; Huppertz, 2008).

Segundo Huppertz (2008), a classificação da PE em precoce e tardia corresponde a diferentes formas da doença quanto à sua etiologia e quanto à forma clínica de manifestação. Quando seu aparecimento é precoce, apresenta-se na forma grave, geralmente associada com alterações do Doppler da artéria uterina, fetos com restrição de crescimento intrauterino (Murphy & Stirrat, 2000; Ness & Sibai, 2006) e maior taxa de recorrência (Redman & Sargent, 2005). Por outro lado, a PE tardia está frequentemente associada com índice de resistência uterina normal ou discretamente aumentado, baixa taxa de comprometimento fetal e resultados perinatais mais favoráveis (Sibai et al., 2005; Ness & Sibai, 2006).

Na gestação normal ocorre resposta inflamatória sistêmica leve, que segundo Sacks et al. (2003) parece ser resultante da ativação da imunidade inata. A maior ativação desse tipo de imunidade não indica doença, mas sim um mecanismo protetor do organismo materno contra infecções, uma vez que a reatividade da resposta imune específica ou adaptativa se encontra ligeiramente diminuída (Wegmann et al., 1993). Assim, a leucocitose é evidente no primeiro trimestre e aumenta com o avanço da gestação. Neutrófilos e monócitos encontram-se ativados e apresentam aumento da capacidade fagocítica e da produção de citocinas (Koumandakis et al., 1986; Barriga et al., 1994; Sacks et al., 2003). A adaptação materna à gestação requer uma interação proeminente e rigidamente controlada entre as imunidades inata e adaptativa, para permitir o crescimento e desenvolvimento normais do semi enxerto fetal (Van Rijn et al., 2008).

Na PE ocorre uma reação inflamatória sistêmica, semelhante à observada na gestação normal, porém de maior intensidade (Redman et al., 1999; 2005). Portanto, essa doença parece ser resultante de uma ativação exacerbada da resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias, como monócitos e granulócitos, bem como células endoteliais (Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006; Lok et al., 2009). Essa patologia é caracterizada por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Johnson et al., 2002; Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007; 2011), bem como diminuição na produção de IL-10, importante fator capaz de regular a resposta inflamatória (Cristofalo et al., 2013; Peraçoli et al., 2013; Raghupathy, 2013). Concentrações elevadas de quimiocinas IL-8, CXCL10/IP-10 e proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1) também estão presentes nas gestantes pré-eclâmpticas em comparação com gestantes normais (Gotsch et al., 2007; Fasshauer et al., 2008; Szarka et al., 2010; De Oliveira et al., 2011; Kalinderis et al., 2011). Além disso, associação entre produção mais elevada de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e aumento da ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (Giorgi et al., 2012) sugere que os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes dessas citocinas inflamatórias podem estar associados às manifestações mais graves da PE. A resposta inflamatória sistêmica exacerbada na PE parece estar relacionada com a liberação de substâncias capazes de induzir inflamação, tais como fragmentos de membranas do sincitiotrofoblasto, micropartículas solúveis incluindo exossomos que carregam

quimiocinas, citocinas inflamatórias, enzimas, microRNAs e proteínas sinalizadoras, no plasma das gestantes, capazes de ativar células da imunidade inata (Chen et al., 2012; Cheng & Sharma, 2016) e podem desempenhar importante papel na fisiopatologia da PE (Redman & Sargent, 2007).

Em muitas pacientes com PE observa-se hiperuricemia, que se correlaciona com proteinúria elevada e gravidade da doença (Peraçoli et al., 2013). Segundo Bainbridge & Roberts (2008), o ácido úrico tem potencial de promover inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial. O ácido úrico pode ser considerado um mediador da inflamação, uma vez que estimula a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  por células mononucleares humanas e MCP-1 por células musculares vasculares de ratos (Johnson et al., 2003; Kanellis et al., 2003). Correlação positiva entre o aumento da produção da citocina inflamatória TNF- $\alpha$ , de ânion superóxido e concentração sérica elevada de ácido úrico foi demonstrada na PE (Peraçoli et al., 2011). Além disso, observou-se associação entre níveis plasmáticos elevados de ácido úrico, proteína de choque térmico 70 (Hsp70), IL-1 $\beta$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  nos casos graves dessa doença (Peraçoli et al., 2013). Assim, a hiperuricemia em gestantes com PE pode representar importante contribuição para a fisiopatologia da PE.

Durante os estágios iniciais da gestação, é observado um balanço entre as células da imunidade adaptativa classificadas em subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>, Th1 e Th2, de acordo com o perfil de citocinas que produzem. Na gestação normal esse balanço está fisiologicamente desviado em favor do perfil Th2, resultando na manutenção da tolerância materna e no desenvolvimento fetal (Raghupathy, 2008). A rede de citocinas envolvidas nos processos relacionados à gestação é complexa, uma vez que estes mediadores podem influenciar mecanismos envolvidos na implantação do ovo, na evolução da gestação e no mecanismo de parto. As interações sinérgicas entre as citocinas são dinâmicas e moduladas pelos hormônios relacionados à gravidez. Alterações nesses mediadores podem estar associadas com complicações como abortamento, PE e parto prematuro (Orsi & Tribe, 2008).

A literatura mostra que na PE existe ativação de resposta imune mediada por células T, caracterizada pela produção de citocinas de perfil Th1 como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e TNF- $\alpha$ , tanto no sangue periférico como na interface materno-fetal (Saito & Sakai, 2003; Saito et al., 2007a; Tosun et al., 2010; Darmochwal-Kolarz et al., 2012). Esses linfócitos T estão ativados e relacionados ao mecanismo

inadequado de tolerância materna, presente nessa patologia. Portanto, na PE o perfil predominante Th1 induz ativação de macrófagos, de reações citotóxicas e inflamatórias em detrimento do perfil Th2, relacionado à secreção de citocinas com atividade anti-inflamatória e reguladora como IL-10 e fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e que caracterizam o perfil imunológico da gestação normal (Saito et al., 2010).

Atualmente, esse paradigma Th1/Th2 já não é suficiente para explicar a tolerância materna e acredita-se que outro mecanismo regulatório possa estar envolvido na resposta ao semi enxerto fetal e nas patologias da gestação.

Células T *naïve* com fenótipo CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar em células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias (Treg), dependendo do estímulo a que estão sujeitas (Saito et al., 2007; Saito, 2010). Células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) têm papel importante no desenvolvimento e manutenção da tolerância em tecidos periféricos (Kuniyasu et al., 2000; Baecher-Allan et al., 2001) e expressam níveis elevados de CD25 (IL-2R $\alpha$ ), antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) e o fator de transcrição FoxP3 (Sakaguchi et al., 2001; Fontenot et al., 2003; Waldman et al., 2004). Essas células Treg desempenham importante papel na interface materno-fetal, assegurando a tolerância imune ao alo-enxerto fetal e a manutenção da gestação (Teles et al., 2013).

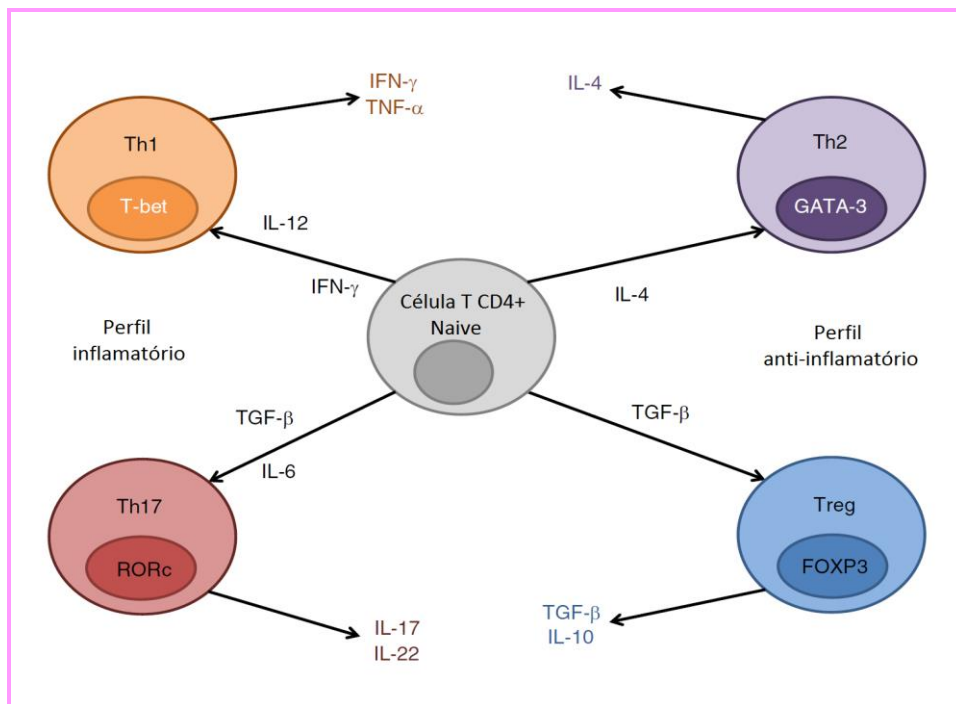
Resultados de estudos sobre a população de células Treg no sangue periférico de gestantes com PE são controversos, havendo relatos de que essa população celular está diminuída (Sasaki et al., 2007; Darmochwal-Kolarz et al., 2007; Santner-Nanan et al., 2009), enquanto outros referem números similares dessas células em gestantes normotensas e pré-eclâmpticas (Paeschke et al., 2005; Hu et al., 2008).

A subpopulação de linfócitos CD4<sup>+</sup> denominada Th17, por sua capacidade de produção de IL-17, foi descrita por participar de um fenótipo predominante Th1/Th17 sobre Th2/Treg em condições inflamatórias crônicas. O aumento dessa subpopulação pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de doenças autoimunes ou reações de rejeição de enxertos (Darmochwal-Kolarz et al., 2012).

O ambiente de citocinas tem papel chave na diferenciação das células T. A geração das células Th1 ocorre na presença das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-18 as quais são potentes mediadores inflamatórios e importantes na ativação da resposta imune adaptativa (Conforti-Andreoni et al., 2011). A presença de IL-4 é responsável

por diferenciar as células Th2, enquanto as células Th17 se diferenciam na presença de IL-6 e TGF- $\beta$  e esta subpopulação desempenha um papel crítico na indução da inflamação, na patogênese das doenças autoimunes (Crome et al., 2009; Peck, Mellins, 2010). Por outro lado, as células T reguladoras, essenciais na manutenção da auto tolerância e na regulação da inflamação, desempenham importante papel na manutenção da gestação e são diferenciadas na presença predominante de TGF- $\beta$  (Saito et al., 2007; Saito et al., 2010; Figueiredo & Schumacher, 2016).

A diferenciação de células T está relacionada também com fatores de transcrição. Células Th1, Th2, Th17 e Treg têm sua diferenciação regulada também pelos fatores de transcrição T-bet (*T box transcription factor*), GATA-3 (*GATA binding protein 3*), RORc (*retinoic acid-related orphan receptor C*) e FoxP3 (*forkhead box P3*), respectivamente (Jianjun et al., 2010; Figueiredo & Schumacher, 2016) (figura 1). As células Th1, Th17 e Treg estão relacionadas e possuem plasticidade podendo se converter umas nas outras (Peck & Mellins, 2010; Saito et al., 2010).



**Figura 1:** Diferenciação de células T *naïve*, em fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg (adaptado de Figueiredo & Schumacher, 2016).

De acordo com Figueiredo & Schumacher (2016), as células Th17 e Treg formam um complexo para manter a homeostase e interagem com outros tipos celulares para orquestrar a resposta imune durante a gestação. No entanto, na PE

esse complexo não ocorre adequadamente, havendo desbalanço entre perfil inflamatório e anti-inflamatório de subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>.

Santner-Nanan et al. (2009) e Darmochwal-Kolarz et al. (2012), relataram uma diminuição das células T reguladoras e um aumento das células com perfil Th17 no sangue periférico de mulheres com PE quando comparadas com grávidas normais, sugerindo ser esse desbalanço responsável pela ativação da resposta inflamatória nessa patologia.

Os dados da literatura demonstram que a PE apresenta resposta inflamatória exacerbada, representada pela ativação de células da imunidade inata. Essa ativação resulta na produção de citocinas inflamatórias que ativam células da imunidade adaptativa, levando ao aumento da inflamação. O conhecimento do fenótipo das subpopulações de células T e o perfil de citocinas produzido por essas células, detectados no sangue periférico de gestantes portadoras de PE, poderá contribuir para a melhor compreensão do envolvimento da imunidade adaptativa na fisiopatologia dessa importante patologia da gestação. Além disso, permitirá verificar se há diferença entre PE precoce e tardia quanto ao número e função dessas células.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 e Treg) e o perfil de citocinas produzido por essas células, em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, classificadas em PE precoce e PE tardia.

### **2.2 Específicos**

**2.2.1.** Determinar a percentagem de subpopulações de células T (Th1, Th2, Th17 e Treg) no sangue periférico de gestantes pré-eclâmpicas e de normotensas pela expressão dos fatores de transcrição, característicos dessas subpopulações;

**2.2.2.** Analisar o perfil de citocinas produzido por essas subpopulações celulares: Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-6, IL-17 e IL-22) e Treg (IL-10 e TGF- $\beta$ 1) no plasma de gestantes pré-eclâmpicas e de normotensas.

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

Foram estudadas 40 gestantes portadoras de PE e 20 gestantes normotensas (NT), que realizaram assistência ao parto na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. A idade gestacional dos grupos estudados foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou por exame ultrassonográfico precoce (<12 semanas de gestação). As gestantes foram consideradas portadoras de PE quando, sem antecedente anterior, manifestaram hipertensão arterial ( $\geq 140 \times 90$  mmHg) associada à proteinúria ( $\geq 300$  mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20ª semana de gestação (NHBPEP, 2000).

As gestantes com PE foram estratificadas, segundo Huppertz (2008), em dois grupos, de acordo com a idade gestacional no momento do diagnóstico da doença: menor que 34 semanas (pré-eclâmpsia precoce – n=20) e igual ou maior que 34 semanas (pré-eclâmpsia tardia – n=20). As gestantes normotensas foram pareadas com as pré-eclâmplicas pela idade gestacional.

O tamanho amostral desse projeto foi calculado, considerando-se a diferença de médias de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  entre gestantes portadoras de PE e normotensas, com base nos resultados apresentados em trabalho anterior (Giorgi et al., 2012). Considerando-se uma confiabilidade de 95%, poder de 90% e 20% de variabilidade nos valores dessas citocinas, o tamanho amostral foi de no mínimo 20 indivíduos por grupo.

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1 e 2). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, parecer nº 1.047.289 (anexo 3).

#### 3.2 Critérios de inclusão

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

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

### **3.3 Critérios de não-inclusão**

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

### **3.4 Dosagem de proteinúria**

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

### **3.5 Colheita de sangue e separação do plasma**

Foram coletados 10 mL de sangue periférico, por punção venosa, para avaliação das subpopulações de células T e determinação de citocinas em gestantes portadoras de PE no momento do diagnóstico da doença. A amostra de sangue de gestantes normotensas foi coletada no momento em que foram pareadas pela idade gestacional com gestantes pré-eclâmplicas. O sangue colhido foi colocado em tubo estéril contendo 10 U/mL de EDTA (Becton Dickinson-BD Vacutainer, NJ, EUA) e após centrifugação a 1500 rpm por 10 min, o plasma obtido foi armazenado a -80°C até o momento da determinação das citocinas.

### **3.6 Isolamento e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)**

As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), segundo técnica previamente descrita (Peraçoli et al., 2011). O anel rico em células mononucleares foi lavado duas vezes com meio de cultura RPMI 1640/HEPES (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) por 10 min a 1500 rpm. Após esse procedimento, as

células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640/HEPES (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (RPMI completo) e contadas com auxílio de câmara de Neubauer. Para identificação das células mononucleares, 50 µL da suspensão de células mononucleares foram incubadas por 10 min a 37°C com 450 µL da solução de vermelho neutro a 0,02%. A concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células viáveis/mL, as células foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços (Falcon, Corning Incorporated- Life Sciences, Durham, EUA) e incubadas a 37°C, em tensão de 5% de CO<sub>2</sub> por 90 minutos. As células não-aderentes à placa foram obtidas por meio de lavagem dos orifícios da placa com meio de cultura RPMI 1640/HEPES (LGC Biotecnologia), sendo a viabilidade estimada por exclusão de coloração com azul Trypan 0,2 %. A concentração celular foi ajustada para  $2 \times 10^5$  células viáveis/mL para a caracterização das subpopulações de células T por citometria de fluxo.

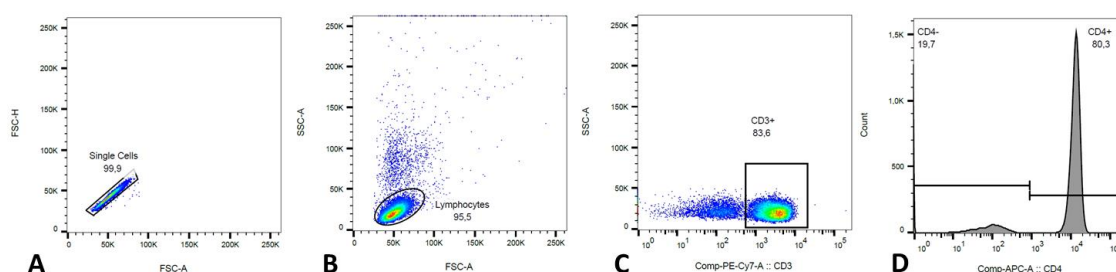
### **3.7 Análise da expressão dos fatores de transcrição em linfócitos T pela técnica de citometria de fluxo**

A expressão dos fatores de transcrição intracitoplasmáticos para células Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3), Th17 (RORc) e Treg (FoxP3) foi avaliada após colheita do sangue (expressão endógena). A concentração celular foi ajustada para  $2 \times 10^5$  células/mL, conforme descrito no item 3.6 e as células distribuídas em tubos Falcon para citômetro (BD Biosciences). As células foram incubadas com anticorpos BD Biosciences, com os respectivos fluorocromos: anti-CD3 (PE-Cy7), anti-CD4 (APC), anti-CD25 (APC-H7) e anti-CD127 (BB515) por 30 min, no escuro. Após centrifugação as células foram lavadas com *Wash Buffer* (BD Biosciences) e centrifugadas novamente por 5 min a 400g. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando-se *Perm Buffer* (BD Biosciences) para incubação com anticorpos BD Biosciences, marcados com fluorocromos específicos contra as proteínas intracelulares T-bet (PerCP-Cy5.5), GATA-3 (PE), RORc (PE) e FoxP3 (PE) por 30 min, no escuro e em temperatura ambiente. Para a delimitação dos gates, tubos controles foram incubados com anticorpos isotípicos específicos para cada fluorocromo (PE-Cy7, APC, APC-H7, BB515, PerCP-Cy5.5 e PE) em cada teste realizado. No caso das medições, foram necessários 30.000 eventos para cada amostra adquirida em citômetro de fluxo *FACSCanto™* II (BD Biosciences) com

software *FACSDIVA* (BD Biosciences). Os resultados foram analisados no *software FlowJo*, versão vX.10.6 (FlowJo, LLC).

### 3.7.1 Estratégia de análise fenotípica dos linfócitos por citometria de fluxo

Para uma análise mais refinada do fenótipo dos linfócitos de gestantes portadoras de PE e de NT, delineou-se estratégia de *gates* demonstrada na figura 2. Inicialmente, com base nos parâmetros tamanho em área (FSC-A) por tamanho em altura (FSC-H) construímos o *gate singlets*, objetivando evitar dados de células aglomeradas ou conjugadas (figura 2A). Dentro desse *gate*, delineou-se novo *gate* relacionado ao tamanho (FSC-A) e granularidade (SSC-A) esperados para linfócitos (figura 2B), os quais estão localizados na região de células menores e com poucos grânulos. Dentro do *gate* linfócitos, construiu-se outro *gate*, com base na positividade para o marcador CD3<sup>+</sup> (figura 2C). Por fim, delineou-se novo *gate* que selecionou apenas células CD4<sup>+</sup> (figura 2D), dentro do qual foram analisados os fatores de transcrição para os perfis Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3), Th17 (RORc) e Treg (FoxP3).

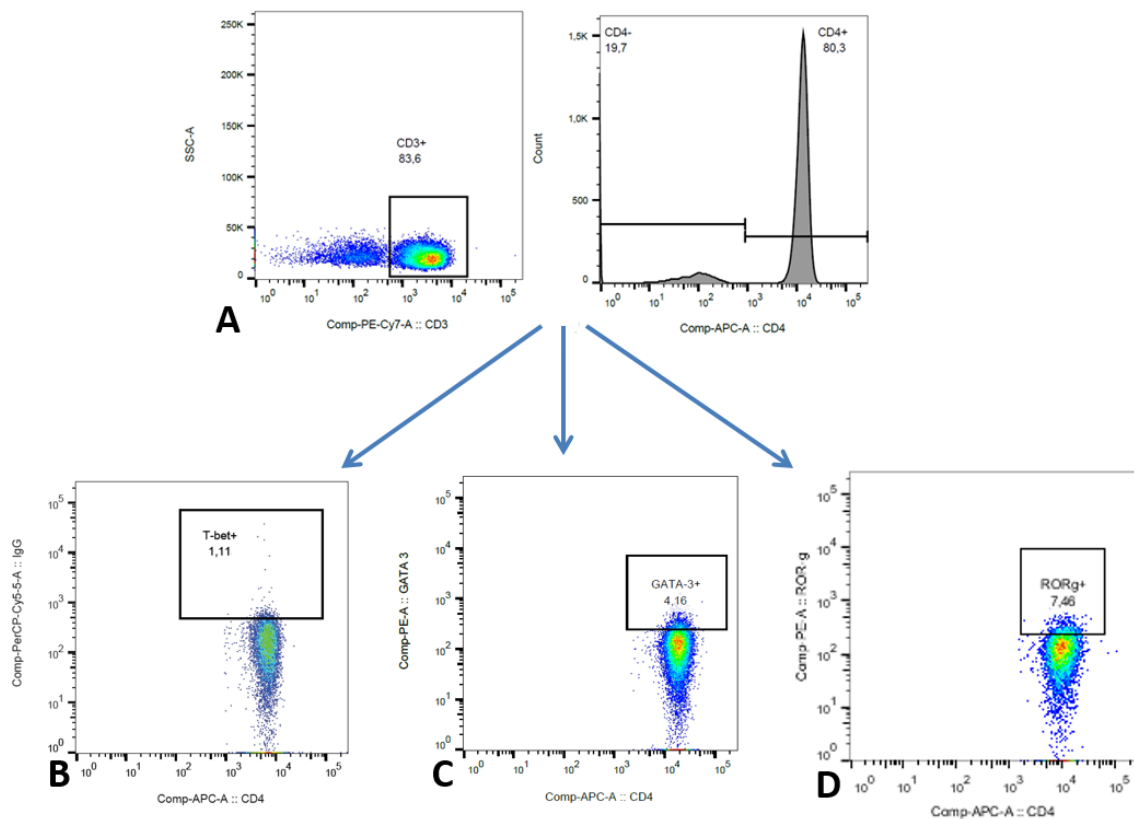


**Figura 2.** Estratégia de análise fenotípica dos linfócitos de gestantes com PE por citometria de fluxo. Pseudocolor e histograma demonstrando os *gates* de análise da população de linfócitos. **(A)** O *gate singlets* baseou-se na análise de células únicas. **(B)** O *gate* linfócitos foi relacionado ao tamanho e granularidade da população em questão. **(C)** O *gate* CD3<sup>+</sup> representa a seleção de células positivas para esse marcador. **(D)** Histograma demonstrando o *gate* CD4<sup>+</sup>, no qual os fatores de transcrição foram analisados. O histograma demonstra a percentagem de células expressando marcador CD4 positivas (CD4<sup>+</sup>) e CD4 negativas (CD4<sup>-</sup>).

### 3.7.2 Estratégia de análise para perfis Th1, Th2 e Th17 de linfócitos por citometria de fluxo

Para a análise de perfis de linfócitos Th1, Th2 e Th17 (figura 3) de gestantes com PE, realizou-se o *gate* de linfócitos positivos para CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e dentro dessa

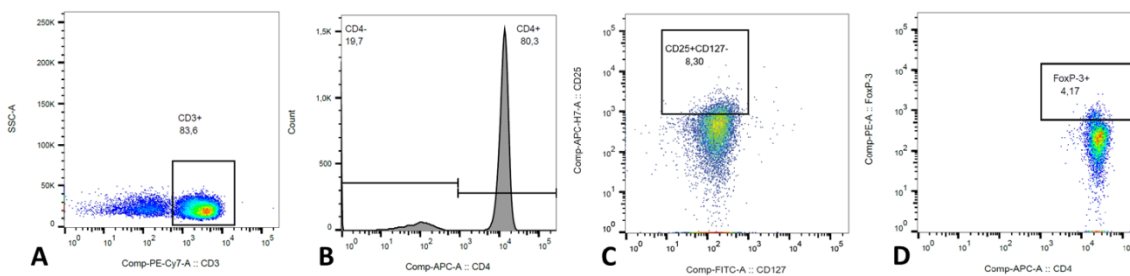
população analisaram-se os fatores de transcrição T-bet específico para subpopulação Th1, GATA-3 específico para Th2 e RORc específico para Th17.



**Figura 3.** Estratégia de análise fenotípica dos linfócitos de gestantes com PE por citometria de fluxo. **(A)** Pseudocolor (CD3<sup>+</sup>) e histograma (CD4<sup>+</sup>) demonstrando os *gates* de análise da população de linfócitos. **(B)** Pseudocolor demonstrativo de células CD4<sup>+</sup> que expressam o fator de transcrição T-bet (Th1). **(C)** Pseudocolor demonstrativo de células CD4<sup>+</sup> que expressam o fator de transcrição GATA-3 (Th2). **(D)** Pseudocolor demonstrativo de células CD4<sup>+</sup> que expressam o fator de transcrição RORc (Th17).

### 3.7.3 Estratégia de análise para perfil Treg de linfócitos por citometria de fluxo

Como forma de análise (figura 4), partiu-se de linfócitos CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (4A e 4B), para analisar as células que eram CD25<sup>+</sup> e CD127<sup>-</sup> (figura 4C). A partir desta população analisou-se a molécula FoxP3 (figura 4D) e as células positivas para este marcador foram consideradas os linfócitos Tregs, conforme descrito por Vergati et al. (2011).



**Figura 4.** Estratégia de análise fenotípica dos linfócitos T reguladores de gestantes com PE. Pseudocolor **(A)** e histograma **(B)** demonstrando os *gates* de análise da população de linfócitos. **(C)** Pseudocolor demonstrativo de *gate* para população CD25<sup>+</sup> e CD127<sup>-</sup>. **(D)** Pseudocolor demonstrativo de marcação de FoxP3 nessa população.

### 3.8 Avaliação da expressão dos transcritos relacionados aos fatores de transcrição respectivo de cada subpopulação pela técnica de RT-qPCR

Os PBMCs foram submetidos à análise da expressão em nível transcricional. O RNA total dos PBMCs foi extraído por meio do sistema Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canadá), conforme protocolo do fabricante. Após a extração, a fim de garantir a completa remoção de DNA genômico, 1µg de RNA total foi incubado com DNase I Amp Grade (Invitrogen®). A pureza e qualidade relativa de todas as amostras de RNA total obtidas foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop® 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™. Posteriormente, a síntese de DNA complementar (cDNA) para execução da Reação em Cadeia da Polimerase acoplada a transcrição reversa (Reverse Transcription-coupled Polymerase Chain Reaction – RT-PCR) foi realizada com 450ng de RNA total por 60µl de reação, utilizando ImProm-IITM Reverse Transcription System, conforme protocolo do fabricante.

A quantificação da expressão gênica dos fatores de transcrição (T-bet, GATA-3, RORc e FoxP3) foi efetuada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) utilizando GoTaq® RT-qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). O aparelho utilizado foi 7500 Fast Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA).

As diversas variantes dos alvos estudados foram alinhadas no programa MEGA 6 e, posteriormente, cada iniciador foi escolhido por meio do programa Primer-BLAST. Iniciadores situados na junção éxon-éxon garantem a pureza da reação, ou seja, a ausência de qualquer DNA genômico que possa contaminá-la. As

sequências dos iniciadores utilizadas no presente estudo estão detalhadas no Quadro 1.

Cada reação foi definida em duplicata no total de 20µl cada, o qual contém 0,3µM de cada iniciador (sense e anti-sense), 2µl de cDNA, 10µl de master mix e 6,8µl de água livre de nuclease. Adicionalmente, foi inserido um controle negativo, também em duplicata, o qual foi incluído em cada reação a fim de provar que não há contaminação. As condições para a reação de RT-qPCR foram: denaturação inicial a 96°C por 2min e 40 ciclos de 95°C-15s e 60°C-60s, seguido de uma curva *melting*. A amplificação de cada transcrito específico foi confirmada pelo perfil da curva *melting* gerada no final de cada reação.

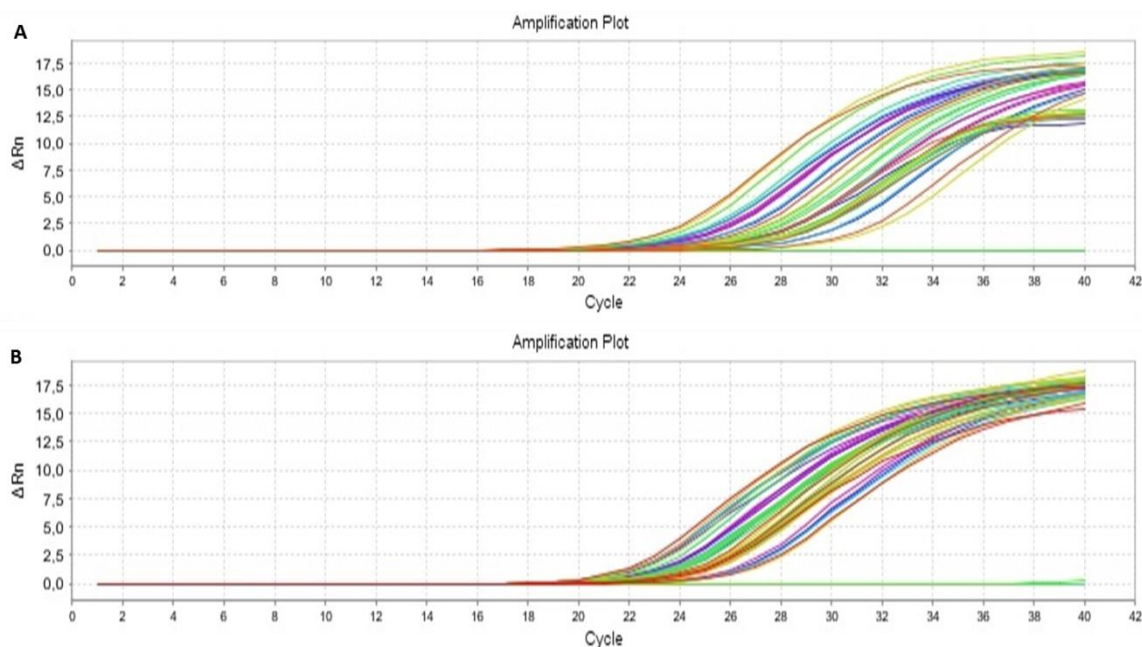
**Quadro 1:** Sequências dos Iniciadores para a análise da expressão dos genes do T-bet, GATA-3, RORc e FoxP3 por RT-qPCR

Alvo	Nome do gene	Sequência (5'-3')	Comprimento do produto	Acesso ao GenBank
<b>FoxP3</b>	FoxP3	Forward primer: (614) CAGGAAGGACAGCACCCCTTT (633) Reverse primer: (726) GGAAGTCCTCTGGCTCTTCG (707)	113pb	NM_014009
<b>GATA-3</b>	GATA3	Forward primer: (174) CTCTTCGCTACCCAGGTGAC (193) Reverse primer: (269) ACGACTCTGCAATTCTGCGA (250)	96pb	NM_001002295.1
<b>RORc</b>	RORC	Forward primer: (363) CATGTCCCGAGATGCTGTCA (382) Reverse primer: (473) GGTCCTGTTGCTGCTGTTG (454)	111pb	NM_005060.3
<b>T-bet</b>	T-bet	Forward primer: (906) GGATGCGCCAGGAAGTTTCA (925) Reverse primer: (993) TGGAGCACAATCATCTGGGT (974)	88pb	NM_013351
<b>Controles internos da reação</b>				
<b>GAPDH</b>	GAPDH	Forward primer: (684)CGTGGAAAGGACTCATGACCA(703) Reverse primer: (801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	118pb	NM_002046.4
<b>ACTB</b>	β-actina	Forward primer:(1061)AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT(1083) Reverse primer: (1180)CGGACTCGTCATACTCCTGC(1161)	120pb	NM_001101.3

### 3.8.1 Padronização da escolha do normalizador utilizado na técnica de RT-qPCR

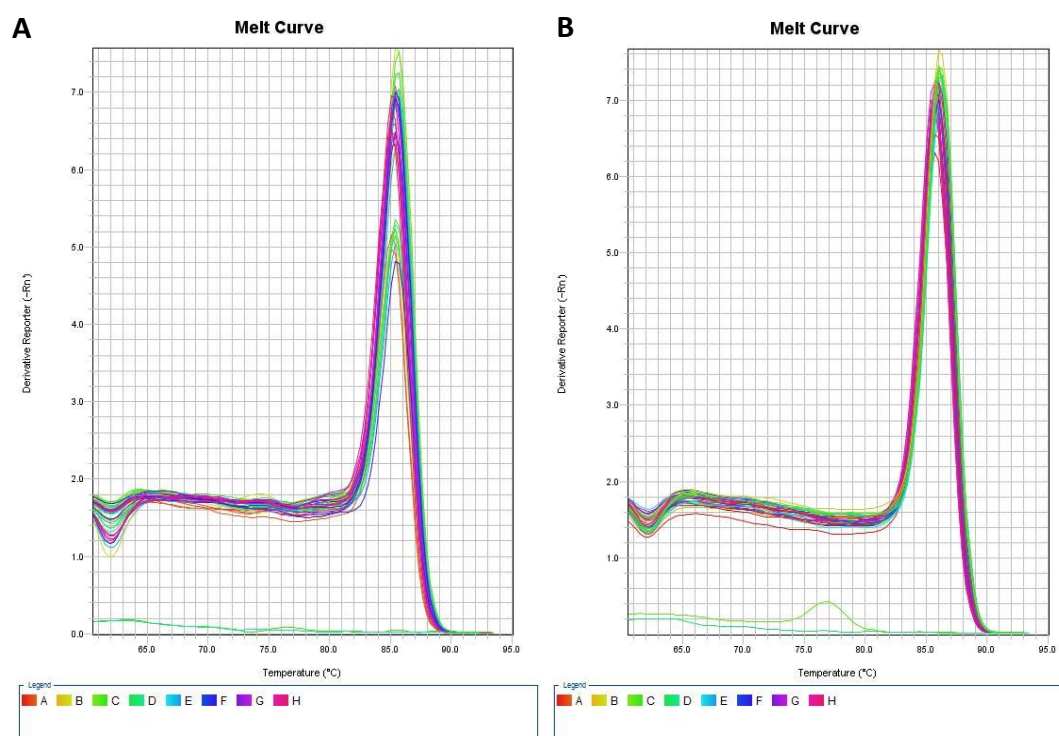
O RNAm extraído de PBMCs de mulheres saudáveis não-grávidas (n=5), foi utilizado para padronização da técnica de RT-qPCR. As figuras 5A e 5B representam as curvas de amplificação do gene da β-actina e da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), respectivamente. Pode-se observar que as curvas de amplificação da β-actina (figura 5A) apresentaram uma maior diferença entre seus Cts do que a diferença observada para as curvas do GAPDH

(figura 5B). Portanto, para normalização das reações de RT-qPCR, foi utilizado o GAPDH, o qual demonstrou maior uniformidade de amplificação.



**Figura 5:** Representação gráfica das curvas de amplificação da expressão gênica de  $\beta$ -actina (**A**) e GAPDH (**B**) de PBMCs de mulheres não-grávidas (n=5) pela técnica de RT-qPCR.

A curva de dissociação mede a temperatura de dissociação dos produtos amplificados e deve conter apenas um pico, indicando ausência de produtos inespecíficos na reação, assim como dímeros de primers (iniciadores) que podem ser identificados como amplificação, já que formam estruturas dupla-fita, permitindo a incorporação do marcador fluorescente Syber Green. As reações apresentaram pico único de curva de dissociação para cada amostra, comprovando a especificidade da reação (figura 6). Novamente, o emprego do GAPDH (figura 6B) confirma a escolha desse normalizador para a técnica de RT-qPCR.



**Figura 6:** Representação gráfica da curva de dissociação da  $\beta$ -actina **(A)** e GAPDH **(B)** por PBMCs de mulheres saudáveis não-grávidas (n=5) por RT-qPCR.

Os valores de expressão dos transcritos analisados foram normalizados com base na análise concomitante da expressão do gene codificador da enzima GAPDH. O cálculo da expressão diferencial dos genes selecionados foi efetuado pelo método de processamento de dados em relação a uma curva padrão (Larionov et al., 2005). Todas as condições, inclusive o GAPDH de cada amostra e o controle negativo da reação (No template Control – NTC; sem DNA) foram analisadas em duplicatas. Para análise da expressão relativa, amostras de RNA obtidas de gestantes do grupo controle foram reunidas e, após análise da expressão gênica, essa amostra recebeu o valor relativo de 100. Todas as outras amostras receberam valores relativos a essa amostra.

### 3.9 Detecção das citocinas relacionadas às subpopulações Th1,Th2,Th17 e Treg pela técnica de ELISA

Para quantificação das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Th1), IL-4 (Th2), IL-17, IL-22, IL-6 (Th17) e IL-10 e TGF- $\beta$ 1 (Treg) no plasma das gestantes pré-eclâmpticas e normotensas foi empregado ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se kits comerciais obtidos da R&D Systems (MN, EUA). Os limites de sensibilidade desses

kits foram de 15,6 pg/mL para IFN- $\gamma$ , 10 pg/mL para IL-4, 0,70 pg/mL para IL-6, 3,9 pg/mL para IL-10, 0,7 pg/mL para IL-22, 1,7 pg/mL para TGF- $\beta$ 1 e 0,5 pg/mL para TNF- $\alpha$ . Para a citocina IL-17 foi utilizado kit comercial de alta sensibilidade obtido da Affymetrix eBioscience (CA, EUA). O limite de sensibilidade foi de 0,01 pg/mL. As reações foram desenvolvidas segundo as instruções do fabricante.

### **3.10 Análise Estatística**

Os resultados foram avaliados empregando-se testes paramétricos ou não-paramétricos, segundo o programa estatístico PRISM, (Graph Prism for Windows, version 6.01, GraphPad, CA, EUA). A comparação das características clínicas entre as gestantes foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn. A análise das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e das citocinas presentes no plasma foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Características dos grupos estudados**

A análise das características clínicas das gestantes portadoras de PE e das normotensas mostrou não haver diferença estatística entre os grupos avaliados, com relação ao parâmetro de idade (tabela 1). A comparação entre os grupos de gestantes pré-eclâmpticas e seus respectivos grupos controles, pareados pela idade gestacional também não mostrou diferença estatística. No entanto, os valores da pressão arterial sistólica e diastólica foram significativamente maiores nas gestantes portadoras de PE em relação às gestantes NT. Os níveis de proteinúria foram significativamente mais elevados ( $p < 0,01$ ) no grupo de gestantes com PE precoce em comparação aos demais grupos. No grupo de gestantes com PE tardia esses valores foram significativamente maiores do que nas normotensas de mesma idade gestacional.

**Tabela 1.** Características das gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e normotensas

Parâmetros	PE Precoce (< 34sem) n = 20	PE Tardia (≥ 34sem) n = 20	Normotensas (< 34sem) n = 10	Normotensas (≥ 34sem) n = 10
Idade (anos)	28 (14 – 40)	24 (16 – 43)	25 (18 – 38)	26 (19 – 37)
Idade gestacional (semanas)	29 (26 – 33)	37 (34 – 40)	30 (26 – 33)	37 (34 – 40)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	160 * (140 – 200)	155 * (140 – 180)	105 (95 – 110)	100 (95 – 110)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	110 * (90 – 140)	100 * (90 – 120)	65 (60 – 70)	60 (60 – 70)
Proteinúria (mg/24h)	3105 <sup>#</sup> (300-26.052)	535 <sup>+</sup> (300-10.800)	<300	<300

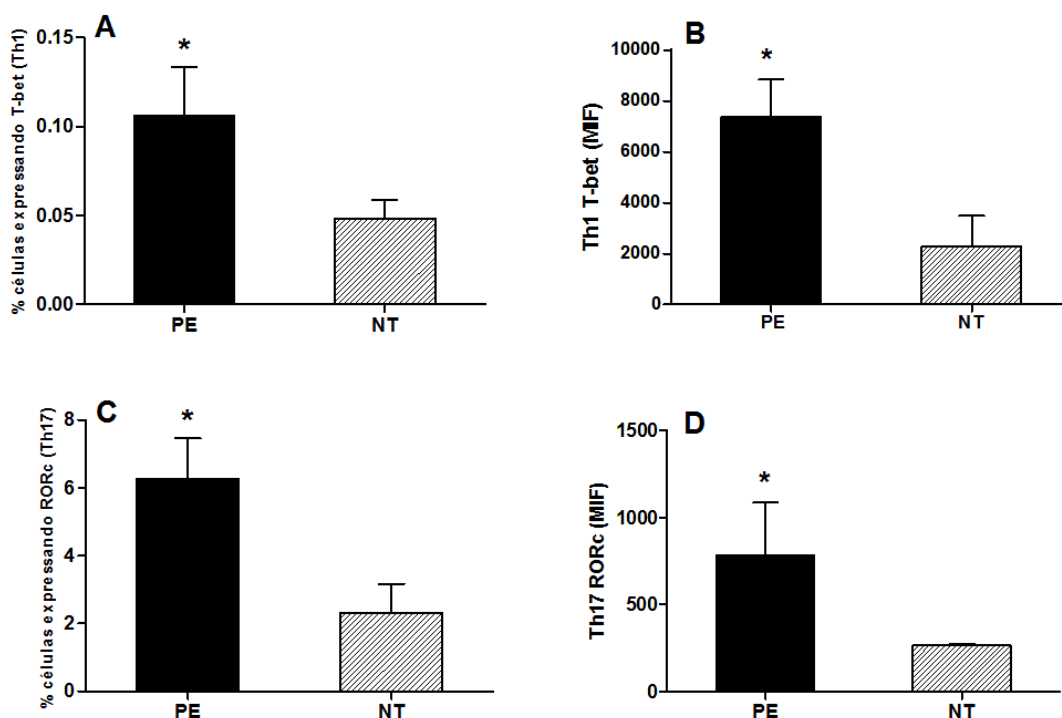
Resultados expressos em mediana (valores mínimo e máximo entre parênteses)

\* ( $p < 0,01$ ) vs NT <34s; NT ≥ 34s; # ( $p < 0,01$ ) vs NT <34s; NT ≥ 34s; PE tardia; + ( $p < 0,05$ ) vs NT ≥ 34s (teste de Kruskal-Wallis).

#### 4.2 Expressão de fatores de transcrição em subpopulações de linfócitos pela técnica de citometria de fluxo

A figura 7 mostra duas análises de subpopulações de perfis inflamatórios (Th1 e Th17): a percentagem de linfócitos expressando os respectivos fatores de transcrição e a média de intensidade de fluorescência (MIF) das proteínas intracelulares estudadas entre os grupos de gestantes portadoras de PE e de gestantes NT. Primeiramente, os resultados são apresentados abordando-se apenas os grupos de gestantes portadoras de PE e de NT sem a estratificação das idades gestacionais. A análise dos perfis inflamatórios mostra que no perfil Th1, tanto a percentagem de células expressando o fator de transcrição T-bet (figura 7A) como a

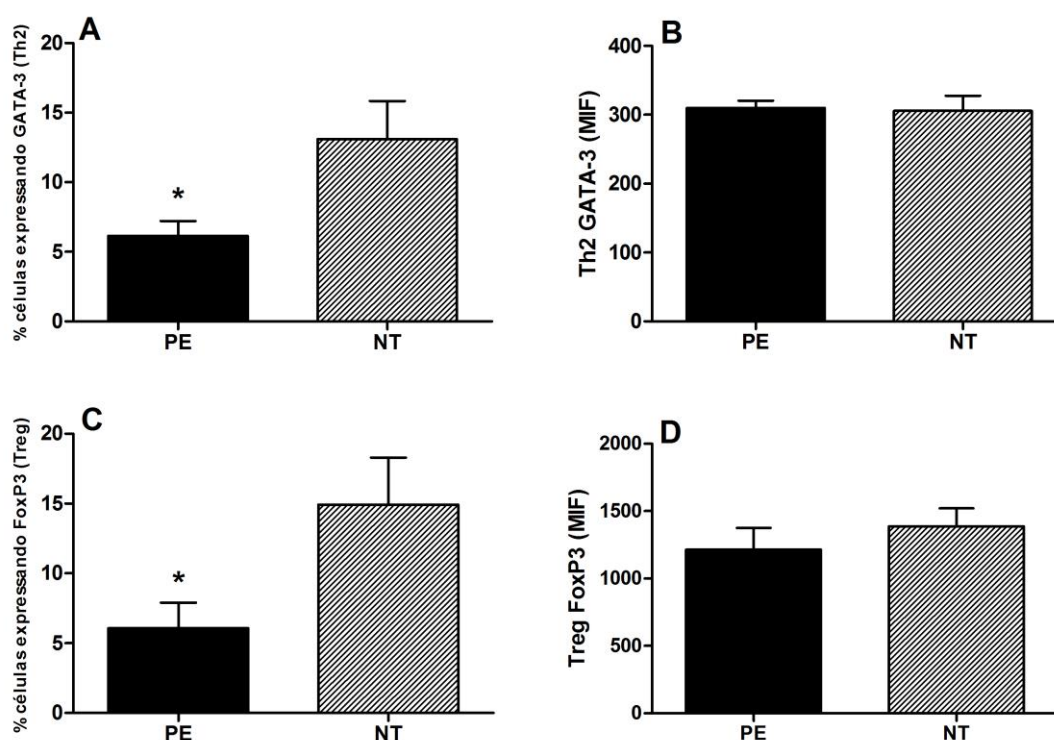
MIF (figura 7B) são significativamente maiores no grupo PE quando comparadas ao grupo NT. A expressão de RORc (perfil Th17), mostra também que a inflamação é predominante na PE, através do aumento significativo da porcentagem de células expressando RORc (figura 7C) e da MIF (figura 7D) nas gestantes pré-eclâmpticas quando comparadas com o grupo controle.



**Figura 7.** Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de intensidade de fluorescência (MIF) em 40 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e 20 gestantes normotensas (NT). **(A)** % de linfócitos expressando T-bet. **(B)** MIF de linfócitos expressando T-bet. **(C)** % de linfócitos expressando RORc. **(D)** MIF de linfócitos expressando RORc. Resultados expressos em média  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  vs. NT (Teste *t* de Student).

Na figura 8 observam-se duas análises de subpopulações de perfis anti-inflamatórios (Th2 e Treg): a percentagem de linfócitos expressando os respectivos fatores de transcrição e a média de intensidade de fluorescência (MIF) das proteínas intracelulares estudadas entre os grupos de gestantes portadoras de PE e de gestantes NT.

As análises dos perfis anti-inflamatórios Th2 e Treg, mostram que a percentagem de linfócitos expressando GATA-3 (figura 8A) e FoxP3 (figura 8C) foi significativamente menor no grupo PE em relação à NT, apesar da MIF (figura 8B; figura 8D) não apresentar diferenças significativas entre PE e NT.

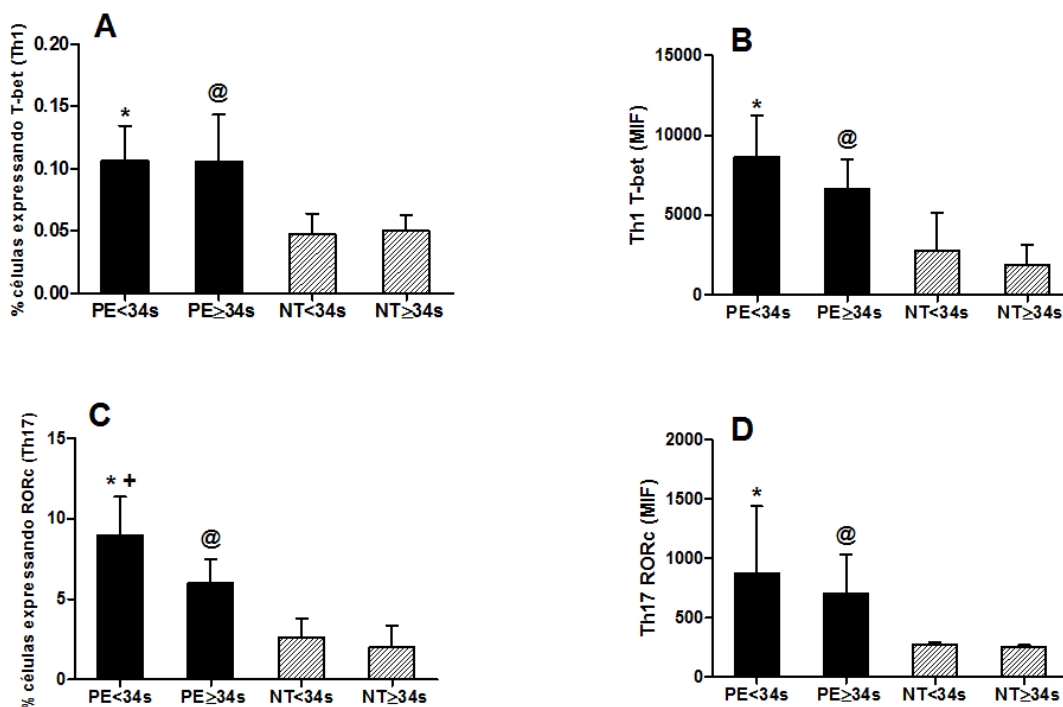


**Figura 8.** Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de intensidade de fluorescência (MIF) em 40 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e 20 gestantes normotensas (NT). **(A)** % de linfócitos expressando GATA-3. **(B)** MIF de linfócitos expressando GATA-3. **(C)** % de linfócitos expressando FoxP3. **(D)** MIF de linfócitos expressando FoxP3. Resultados expressos em média  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  vs. NT (Teste *t* de Student).

Na figura 9 observam-se a percentagem de linfócitos expressando os respectivos fatores de transcrição e a média de intensidade de fluorescência (MIF) das proteínas intracelulares de subpopulações de perfis inflamatórios Th1 e Th17 analisadas de acordo com a estratificação das gestantes em PE precoce (< que 34 semanas) e PE tardia ( $\geq$  que 34 semanas).

O perfil inflamatório Th1 mostrou aumento significativo da percentagem de células expressando T-bet (figura 9A) e da MIF dos linfócitos Th1 (figura 9B) na PE precoce em relação ao grupo NT <34s e o mesmo é visto na PE tardia em relação às NT  $\geq$ 34s, nos dois parâmetros analisados.

A percentagem de células expressando o fator de transcrição RORc (figura 9C) também foi significativamente maior nos grupos PE precoce e PE tardia em comparação com o grupo NT de idade gestacional correspondente. Entre as gestantes com PE, observa-se aumento significativo da percentagem de células Th17 que expressam o RORc no grupo PE precoce em relação ao grupo PE tardia. Na MIF da subpopulação Th17 (figura 9D) foi elevada nas células das gestantes pré-eclâmplicas em relação às NT de mesma idade gestacional.

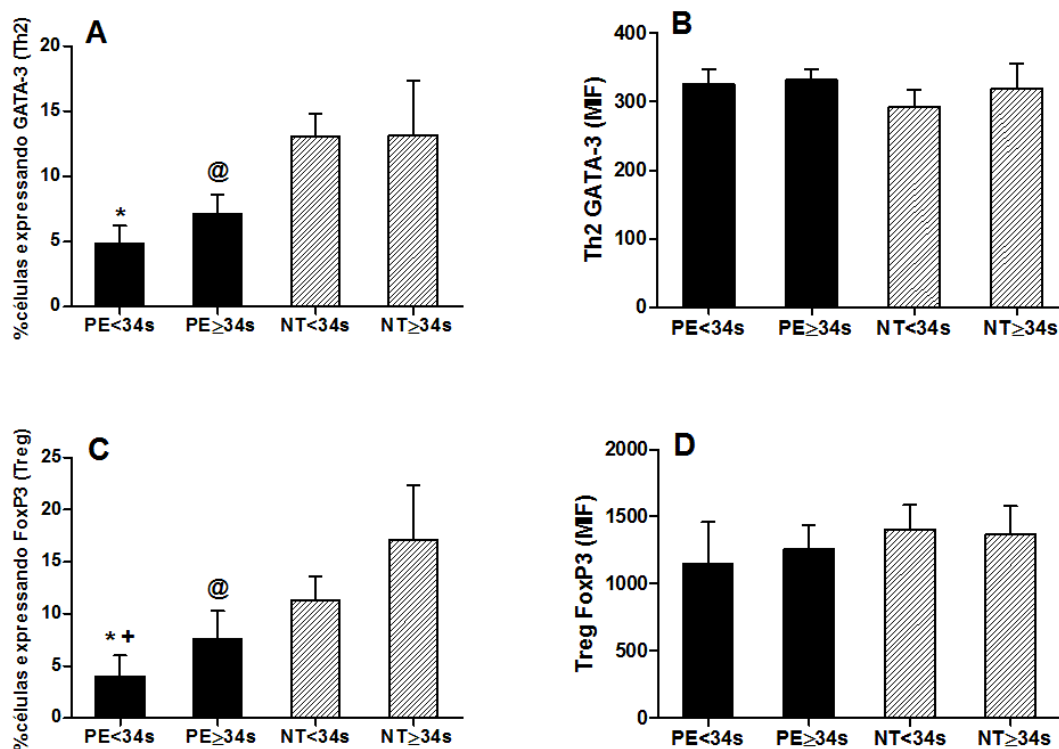


**Figura 9.** Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de intensidade de fluorescência (MIF) em 20 gestantes portadoras de PE precoce (PE<34s), 20 gestantes portadoras de PE tardia (PE≥ 34s), 10 gestantes normotensas (NT<34s) e 10 gestantes normotensas (NT ≥ 34s). **(A)** % de linfócitos expressando T-bet. **(B)** MIF de linfócitos expressando T-bet. **(C)** % de linfócitos expressando RORc. **(D)** MIF de linfócitos expressando RORc. Resultados expressos em média ± SD. \*  $p < 0,05$  vs. NT <34s; @  $p < 0,05$  vs. NT ≥ 34s; +  $p < 0,05$  vs. PE ≥ 34s (ANOVA).

A figura 10 representa a percentagem de linfócitos expressando os respectivos fatores de transcrição e a média de intensidade de fluorescência (MIF) das proteínas intracelulares de subpopulações de perfis anti-inflamatórios Th2 e Treg analisadas de acordo com a classificação das gestantes em PE precoce e em PE tardia.

Primeiramente, nos linfócitos que expressam o fator de transcrição GATA-3 (figura 10A) e FoxP3 (figura 10C), observa-se diminuição significativa da percentagem dessas células na PE precoce ao se comparar com as NT< 34s, o mesmo ocorrendo na PE tardia em relação às NT de mesma idade gestacional. Já no parâmetro MIF (figura 10B; figura 10D), observou-se homogeneidade de resposta, não havendo diferença significativa entre os grupos nos dois perfis avaliados.

Entre as gestantes com PE, observa-se diminuição significativa da percentagem de células Treg que expressam o FoxP3 no grupo PE precoce em relação ao grupo PE tardia (figura 10C).



**Figura 10.** Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de intensidade de fluorescência (MIF) em 20 gestantes portadoras de PE precoce (PE<34s), 20 gestantes portadoras de PE tardia (PE≥ 34s), 10 gestantes normotensas (NT<34s) e 10 gestantes normotensas (NT ≥ 34s). **(A)** % de linfócitos expressando GATA-3. **(B)** MIF de linfócitos expressando GATA-3. **(C)** % de linfócitos expressando FoxP3. **(D)** MIF de linfócitos expressando FoxP3. Resultados expressos em média ± SD. \*  $p < 0,05$  vs. NT <34s; @  $p < 0,05$  vs. NT ≥ 34s; +  $p < 0,05$  vs. PE ≥ 34s (ANOVA).

#### 4.3 Expressão de fatores de transcrição em subpopulações de linfócitos pela técnica de RT-qPCR

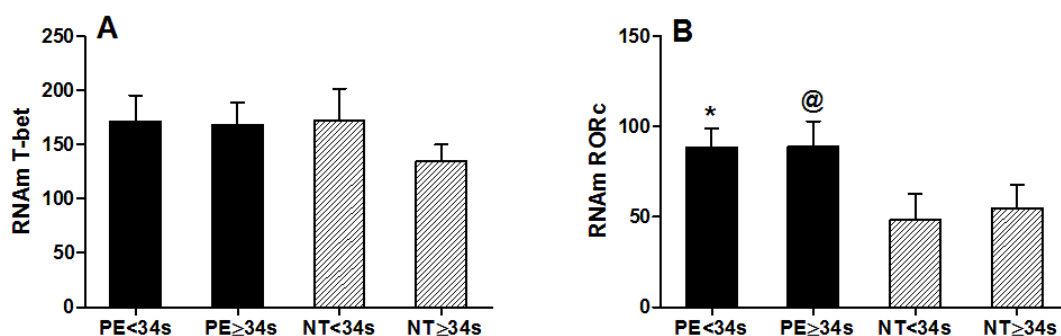
Na figura 11 observa-se a análise da expressão gênica dos fatores de transcrição característicos das subpopulações de perfis inflamatórios Th1 (T-bet) e Th17 (RORc).

Realizou-se a quantificação relativa da expressão dos genes para T-bet, GATA-3, RORc e FoxP3 em PBMCs de 20 gestantes com PE precoce, 20 com PE tardia, 10 gestantes normotensas <34 semanas de gestação e 10 gestantes normotensas ≥ 34 semanas de gestação.

Para o cálculo da quantidade relativa da expressão dos genes foi determinada uma amostra padrão. Assim, considerou-se o valor da amostra padrão igual a 100 e as demais amostras foram estimadas baseando-se nesta amostra padrão.

Na figura 11A, não se observou diferença significativa na expressão gênica do fator de transcrição T-bet em PBMCs de gestantes portadoras de PE precoce e

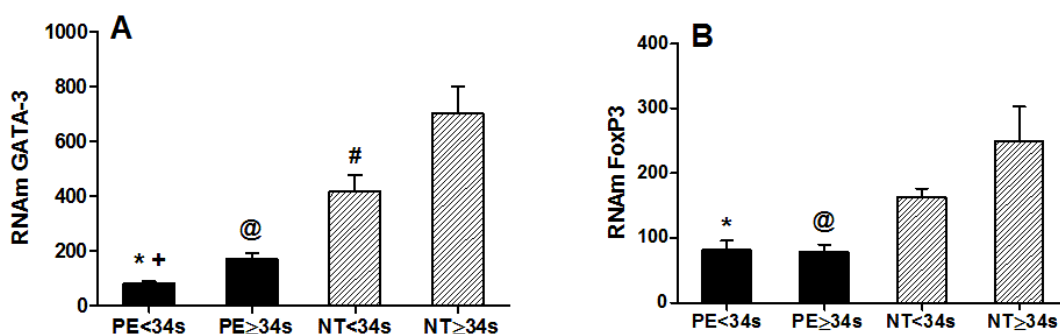
tardia quando comparadas às gestantes NT de mesma idade gestacional. A figura 11B, representa aumento significativo da expressão gênica do fator de transcrição RORc nas gestantes portadoras de PE precoce e tardia em relação às NT com idade gestacional correspondente.



**Figura 11.** Níveis de RNAm dos fatores de transcrição de perfis inflamatórios (quantidade relativa) em PBMCs de 20 gestantes portadoras de PE precoce (PE<34s), 20 gestantes portadoras de PE tardia (PE≥ 34s), 10 gestantes normotensas (NT<34s) e 10 gestantes normotensas (NT ≥ 34s). **(A)** Th1 (T-bet). **(B)** Th17 (RORc). Resultados expressos em média ± SD. \*  $p < 0,05$  vs. NT < 34s; @  $p < 0,05$  vs. NT ≥ 34s (ANOVA).

Na figura 12, está representada a análise da expressão gênica dos fatores de transcrição característicos das subpopulações de perfis anti-inflamatórios Th2 (GATA-3) e Treg (FoxP3).

Expressão significativamente menor dos genes GATA-3 (figura 12A) e FoxP3 (figura 12B) foi detectada em PBMCs de gestantes com PE precoce quando comparadas com as gestantes normotensas de mesma idade gestacional, assim como nas gestantes com PE tardia, em relação às gestantes NT de idade gestacional correspondente. Entre as gestantes pré-eclâmpticas, o nível transcricional do fator de transcrição GATA-3 foi significativamente menor na PE precoce e nas gestantes NT também encontrou-se diferença significativa entre as NT<34s quando comparadas com as NT≥34s.



**Figura 12.** Níveis de RNAm dos fatores de transcrição de perfis anti-inflamatórios (quantidade relativa) em PBMCs de 20 gestantes portadoras de PE precoce (PE < 34s), 20 gestantes portadoras de PE tardia (PE ≥ 34s), 10 gestantes normotensas (NT < 34s) e 10 gestantes normotensas (NT ≥ 34s). **(A)** Th2 (GATA-3). **(B)** Treg (FoxP3). Resultados expressos em média ± SD. \*  $p < 0,05$  vs. NT < 34s; @  $p < 0,05$  vs. NT ≥ 34s; +  $p < 0,05$  vs. PE ≥ 34s; #  $p < 0,05$  vs. NT ≥ 34s (ANOVA).

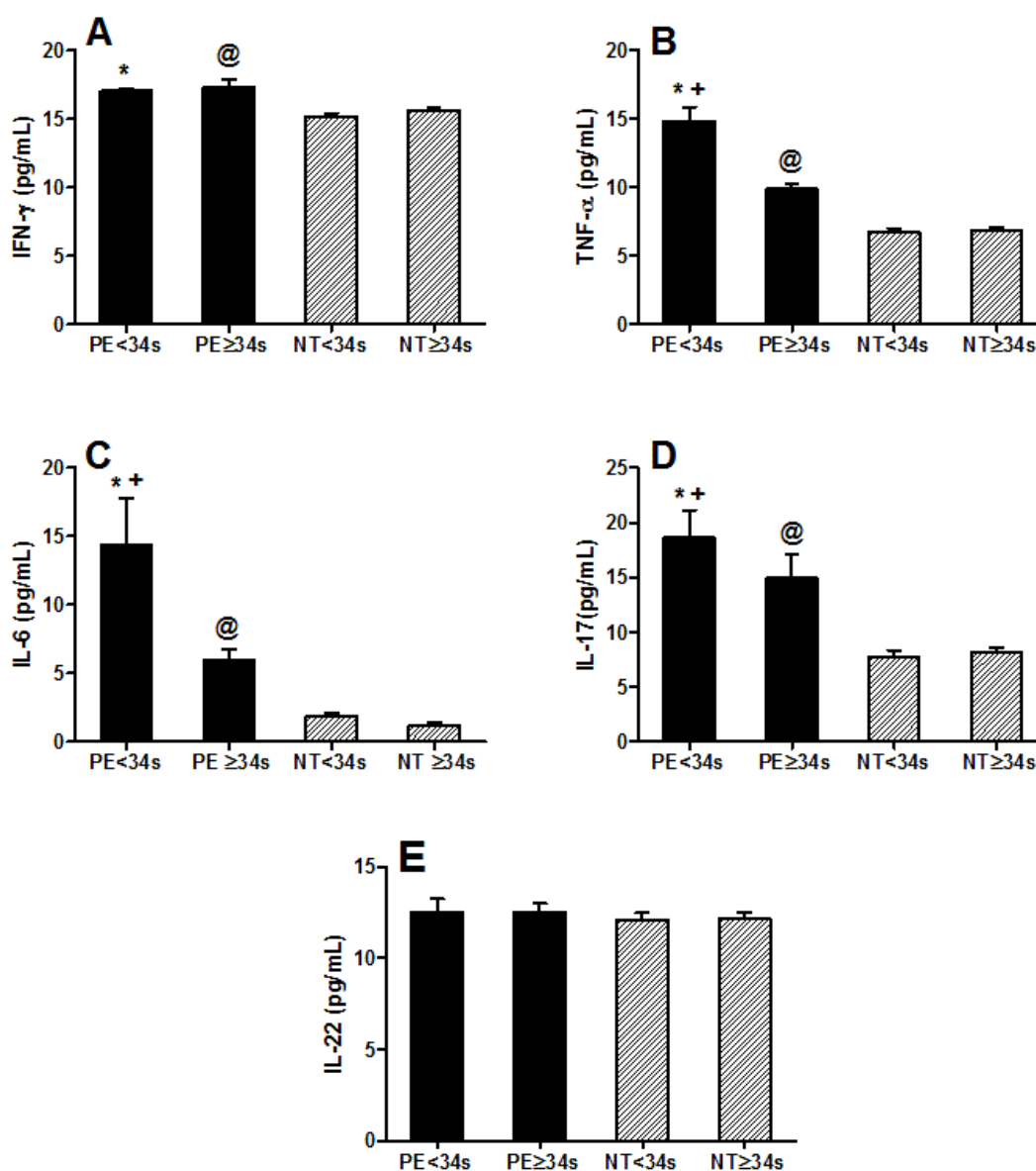
#### 4.4 Determinação das citocinas relacionadas as subpopulações de células T pela técnica de ELISA

Os resultados da dosagem das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22 e TGF- $\beta$ 1 no plasma das gestantes portadoras de PE e normotensas estão representados nas figuras 13 e 14.

As concentrações das citocinas de perfil Th1, IFN- $\gamma$  (figura 13A) e TNF- $\alpha$  (figura 13B), foram significativamente maiores nos grupos de gestantes pré-eclâmpticas em relação aos grupos de NT correspondentes. Além disso, gestantes com PE precoce apresentaram níveis significativamente maiores de TNF- $\alpha$  em relação as gestantes com PE tardia.

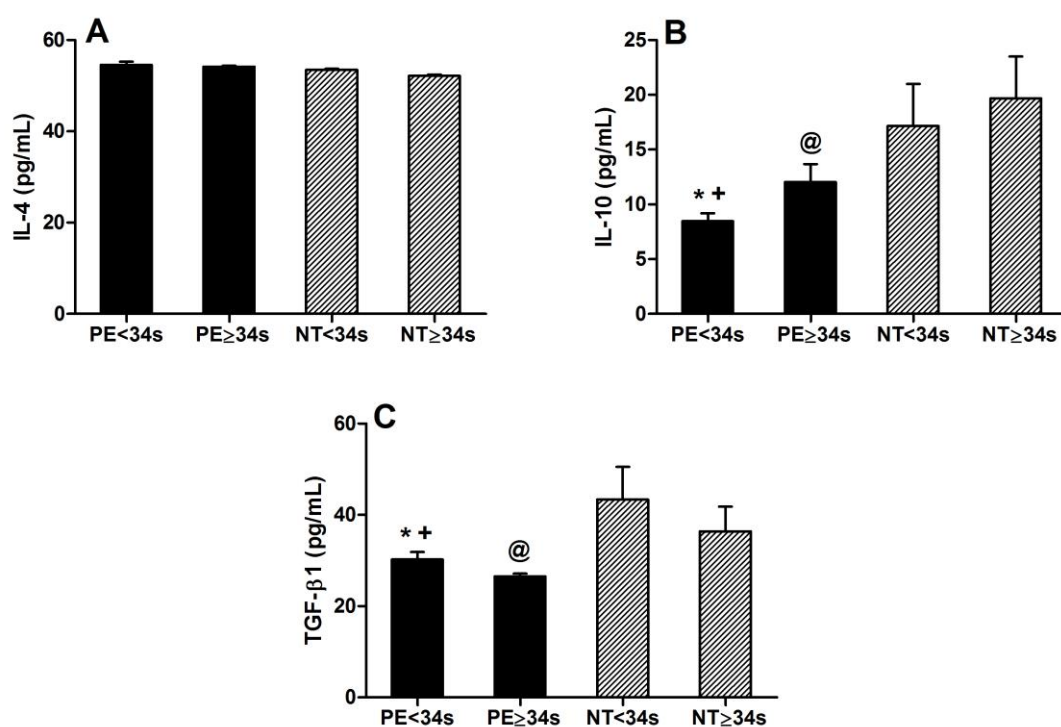
As concentrações plasmáticas de IL-6 (figura 13C) e IL-17 (figura 13D), nas gestantes com PE precoce e PE tardia foram significativamente maiores em relação às NT de idade gestacional correspondente. Entre as gestantes pré-eclâmpticas as concentrações de IL-6 e IL-17 foram significativamente maiores no grupo PE precoce.

As concentrações plasmáticas de IL-22 (perfil Th17) e de IL-4 (perfil Th2), não mostraram diferença significativa entre os grupos estudados (figura 13E;14 A).



**Figura 13.** Expressão proteica de IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), IL-17 (D) e IL-22 (E) no plasma de gestantes portadoras de PE precoce (PE < 34s), 20 gestantes portadoras de PE tardia (PE  $\geq$  34s), 10 gestantes normotensas (NT < 34s) e 10 gestantes normotensas (NT  $\geq$  34s). Resultados expressos em média  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  vs. NT < 34s; @  $p < 0,05$  vs. NT  $\geq$  34s; +  $p < 0,05$  vs. PE  $\geq$  34s (ANOVA).

Os níveis endógenos das citocinas de perfil Treg, IL-10 (figura 14B) e TGF- $\beta$ 1 (figura 14C), foram significativamente menores nas gestantes com PE precoce e PE tardia em relação às gestantes NT de idade gestacional correspondente. Entre as gestantes pré-eclâmplicas observaram-se menores concentrações de IL-10 e maiores de TGF- $\beta$ 1 na PE precoce.



**Figura 14.** Expressão proteica de IL-4 (A), IL-10 (B) e TGF-β1 (C) no plasma de gestantes portadoras de PE precoce (PE<34s), 20 gestantes portadoras de PE tardia (PE≥ 34s), 10 gestantes normotensas (NT<34s) e 10 gestantes normotensas (NT ≥ 34s). Resultados expressos em média ± SD. \*  $p < 0,05$  vs. NT <34s; @  $p < 0,05$  vs. NT ≥ 34s; +  $p < 0,05$  vs. PE ≥ 34s (ANOVA).

## 5. DISCUSSÃO

O presente trabalho caracterizou as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 e Treg) e o perfil de citocinas produzidas por essas células no sangue periférico de gestantes portadoras de PE. Os resultados mostraram que os linfócitos estão endogenamente polarizados para os perfis inflamatórios Th1 e Th17 e apresentam diminuição dos perfis anti-inflamatórios Th2/Treg. Além disso, encontrou-se produção aumentada das citocinas pró-inflamatórias IFN-γ, IL-6, IL-17 e TNF-α e níveis diminuídos de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF-β1. Esses resultados confirmam evidências anteriores de ativação exacerbada de leucócitos circulantes nessas pacientes (Gervasi et al., 2001; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2011; Giorgi et al., 2012) e concordam com relatos que demonstraram diminuição na proporção de células Treg circulantes e aumento nas células Th17 (Sasaki et al., 2007; Prins et al., 2009; Santner-Nanan et al., 2009; Darmochwal-Kolarz et al., 2012; Toldi et al., 2012; Hafeez et al., 2014).

Os linfócitos T são células que expressam o co-receptor CD4 na sua superfície celular e populações distintas com múltiplas funções e várias vias de

diferenciação foram identificadas nessas células. Dependendo das mudanças em diferentes microambientes induzidas por citocinas tais como IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 ou TGF- $\beta$ , os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem diferenciar-se nas subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg desempenhando funções inflamatória, reguladora ou supressora. Nessa diferenciação em subpopulações de linfócitos, os fatores de transcrição intracitoplasmáticos, específicos para cada linhagem, desempenham um papel chave (Zhu et al., 2010). Os mais importantes dentre eles são T-bet, que induz a produção de IFN- $\gamma$  e diferenciação de células Th1 (Szabo et al., 2000), GATA-3, o fator regulador de Th2 e o primeiro regulador principal a ser identificado (Zhang et al., 1997; Zheng & Flavell, 1997), RORc, fator regulador específico de células Th17 (Zhu et al., 2010) e o FoxP3, fator regulador transcricional para células Treg (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Esses fatores são ativados quando uma citocina se liga ao receptor específico. Além desses fatores, outras proteínas de ligação ao DNA e alterações epigenéticas são ativadas, permitindo que ocorra a transcrição adequada da informação genética (Świst & Pajtasz-Piasecka, 2011). Desta forma, confirma-se a importância de se avaliar as subpopulações de células CD4<sup>+</sup> através de seus respectivos fatores de transcrição.

Trabalhos da literatura que tratam da avaliação das subpopulações de células T na PE, analisaram os fatores de transcrição específicos dessas células por meio da expressão gênica (Jianjun et al., 2010; Cao et al., 2015), ou pela expressão proteica desses fatores como visto por Santner-Nanan et al., (2009), Darmochwal-Kolarz et al., (2012) e Toldi et al., (2012). No presente estudo, avaliou-se a expressão gênica e proteica dos fatores de transcrição específicos de Th1/Th2/Th17/Treg em células de sangue periférico de gestantes portadoras de PE, empregando técnicas de RT-qPCR e citometria de fluxo, respectivamente e também a produção de citocinas produzidas por essas subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> no plasma das gestantes com PE. O aumento de perfis inflamatórios Th1/Th17 e diminuição de perfis anti-inflamatórios Th2/Treg nas gestantes portadoras de PE mostram desbalanço entre as subpopulações CD4<sup>+</sup>, evidenciado pelo aumento da expressão gênica e proteica dos fatores de transcrição intracitoplasmáticos T-bet e RORc e pela menor expressão gênica e proteica de GATA-3 e FoxP3 nas gestantes pré-eclâmpticas. Trabalho recente realizado por Gharesi-Fard et al. (2016) avaliou a expressão gênica desses fatores de transcrição na decídua e vilos coriônicos de placentas de gestantes portadoras de PE e de gestantes normais por RT-PCR. Os

autores detectaram diminuição na expressão de FoxP3 e GATA-3 e aumento de T-bet na decídua, enquanto nas amostras coriônicas a expressão de FoxP3 estava diminuída e a de RORc aumentada. A semelhança dos nossos resultados com os desses autores sugere que o desbalanço dessas subpopulações na placenta também é observado nas células circulantes das gestantes portadoras de PE.

As células Th17 foram descritas na gestação bem sucedida e nas complicações como o aborto espontâneo recorrente e PE (Saifi et al., 2014; Fu et al., 2014). Um estudo com as células Th17 envolvidas na patogênese da PE detectou aumento da percentagem de células Th17 no sangue periférico das pacientes com PE grave em comparação com as gestantes saudáveis, sugerindo que a hiper-regulação da imunidade Th17 pode contribuir para desenvolvimento de casos graves de PE (Darmochwal-Kolarz et al., 2012). Por outro lado, as células Treg são consideradas como tendo um papel crucial na implantação dos embriões e na manutenção da tolerância imune materna ao feto (Alijotas-Reig et al., 2014). Zhang et al. (2016) demonstraram que a percentagem de células Treg definidas como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> foi significativamente menor em pacientes com PE grave em comparação com as mulheres grávidas saudáveis. Assim, essa redução das células Treg pode interromper a tolerância imunológica materna, contribuindo para a ocorrência de PE.

Quando as gestantes portadoras de PE foram classificadas de acordo com a idade gestacional de aparecimento das manifestações clínicas da PE verificou-se que gestantes com PE precoce apresentaram maior percentagem de células T CD4<sup>+</sup> expressando o fator de transcrição RORc e diminuição significativa da percentagem de células Treg que expressam FoxP3 em relação à PE tardia, confirmando assim, a gravidade da doença antes da 34<sup>a</sup> semana de gestação, que leva à perda da capacidade de imunorregulação para tolerar a gravidez. Esse desequilíbrio pode ser responsável pela ativação da resposta inflamatória exacerbada que está presente na PE, caracterizada pela ativação das células da imunidade inata e maior produção de citocinas inflamatórias, resultando na intensificação da inflamação e levando à ativação das células da imunidade adaptativa. Não se observaram diferenças entre os grupos de gestantes pré-eclâmpticas com relação à expressão gênica de T-bet, FoxP3 e RORc, embora a expressão de GATA-3 fosse menor nas gestantes com PE precoce. Esses resultados sugerem que a avaliação da percentagem dessas subpopulações, empregando citometria de fluxo e a determinação do perfil de

citocinas por ELISA foram as técnicas mais sensíveis e adequadas para discriminar gestantes portadoras de PE precoce e tardia, com relação ao envolvimento da imunidade adaptativa na patogênese da PE.

As células Th desempenham um papel essencial no sistema imune, sendo as subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg envolvidas na patogênese e progressão da PE, com predominância da produção de citocinas de perfil Th1 e Th17 (Saito & Sakai, 2003; Darmochwal-Kolarz et al., 2012). Nosso estudo, avaliando as citocinas específicas de cada perfil de células Th, confirma que na PE ocorre polarização dessas células para perfil inflamatório. Assim, foi observada produção endógena elevada das citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17 e menor produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ 1, detectadas no plasma de gestantes portadoras de PE. Os níveis aumentados de IFN- $\gamma$  produzidos pelas gestantes pré-eclâmplicas corroboram com os resultados de outros autores que detectaram aumento significativo dessa citocina em plasma de gestantes com PE quando comparadas com gestantes normotensas (Okzan et al., 2014; Barnie et al., 2015).

Os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  foram significativamente aumentados na PE precoce em relação à PE tardia e concordam com resultados prévios obtidos em nosso laboratório (Peraçoli et al., 2013). A maior produção endógena de TNF- $\alpha$  em gestantes com PE está de acordo com a literatura (Beckmann et al., 2004; Peraçoli et al., 2007; 2011) e sugere que os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes do TNF- $\alpha$  podem estar associados às manifestações mais graves da PE e ao estresse oxidativo presente nessa patologia. Nota-se então, que no sangue de gestantes portadoras dessa síndrome ocorre uma exacerbada atividade citotóxica acompanhada por um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 (Tarnowska-Madra et al., 2010), além de IFN- $\gamma$  e IL-17 (Darmochwal-Kolarz et al., 2012; Okzan et al., 2014).

Células T *naïve* estimuladas com TGF- $\beta$  e IL-6 desenvolvem uma resposta Th17, com expressão de IL-17 e IL-22 e são responsáveis pela autoimunidade e a perda da gestação (Saito et al., 2010; Figueiredo & Schumacher, 2016). De acordo com nossos achados, ficou evidente que as gestantes com PE precoce apresentam maior percentagem de células Th17 no sangue periférico e também níveis significativamente maiores de IL-17 em comparação às gestantes NT de mesma idade gestacional e mulheres com PE tardia. Esses resultados concordam com estudos recentes, demonstrando aumento dos níveis circulantes de IL-17 nas

gestantes portadoras de PE quando comparados com gestantes saudáveis e mulheres não grávidas (Molvarec et al., 2015) e com outros autores que detectaram concentração plasmática mais elevada de IL-17 em gestantes com PE grave (Zhang et al., 2016). Considerando que gestantes com PE precoce apresentam manifestações clínicas mais graves do que as gestantes com PE tardia, levando à resposta inflamatória sistêmica excessiva, característica da PE, os altos níveis de IL-17 produzidos pelas células Th17 podem cooperar com outros mediadores imunes para agravar ainda mais a inflamação dos vasos sanguíneos da placenta, contribuindo assim para o desenvolvimento da PE (Darmochwal-Kolarz et al., 2012).

No presente estudo, os níveis mais elevados de IL-6 nas gestantes portadoras de PE precoce em comparação com os grupos de PE tardia e normotensas, reforçam dados da literatura que evidenciaram a polarização para o perfil inflamatório Th17, através do eixo IL-6 e TGF- $\beta$  (Xu et al., 2014). Esse desvio para Th17 ficou ainda mais evidente nas gestantes portadoras de PE precoce, onde o estado inflamatório é mais intenso do que nas gestantes com PE tardia (Peraçoli et al., 2013). A diminuição do perfil anti-inflamatório Th2/Treg nas gestantes pré-eclâmpticas poderia ser explicada pelo ambiente de citocinas inflamatórias predominante nessas gestantes. Uma vez que a IL-1 $\beta$  e a IL-6 podem induzir o desenvolvimento de Th17 a partir da célula ancestral comum de Th17 e Tregs (Afzali et al., 2010; Weaver & Hatton, 2009) pode-se supor que suas concentrações mais altas na PE possam direcionar a diferenciação de Tregs para células Th17 (Rahimzadeh et al., 2016).

Os níveis diminuídos de TGF- $\beta$ 1 nas gestantes com PE e aumentados nas normotensas corroboram com a literatura (Clausen et al., 2002). A polarização de células T CD4<sup>+</sup> para Treg requer ambiente contendo TGF- $\beta$ 1 (Figueiredo & Schumacher, 2016). Portanto, o perfil Treg pode estar diminuído na PE devido a altas concentrações de IL-6, produzidas por células da imunidade inata nas gestantes portadoras de PE (Luppi & Deloia, 2006). Como a secreção de IL-6 suprime as propriedades imunorreguladoras protetoras de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> células Treg (Pasare & Medzhitov, 2003) é possível que o aumento dos níveis de IL-6 possa regular a expansão de células Treg nesta síndrome (Rahimzadeh et al., 2016). Embora os níveis de TGF- $\beta$ 1 estivessem diminuídos nas gestantes portadoras de PE em comparação às normotensas, estes foram mais elevados nas gestantes com PE precoce do que na PE tardia, sugerindo que a associação entre níveis mais

elevados de IL-6 em associação com TGF- $\beta$ 1 poderiam polarizar as células para perfil Th17, com maior produção de IL-17 no grupo PE precoce.

A concentração de IL-4 no plasma das gestantes pré-eclâmpicas não apresentou diferença significativa quando comparada com a de gestantes NT, corroborando os resultados de outros autores (Tarnowska-Madra et al., 2010; Cemgil Arıkan et al., 2012). Também não encontramos diferenças entre os grupos com relação à concentração plasmática de IL-22. Embora Zhang et al. (2016) tenham relatado aumento significativo nos níveis da IL-22 no plasma de gestantes com PE grave quando comparados com o grupo controle, consideramos que o papel da IL-22 na PE precisa ser melhor estudado.

Os níveis plasmáticos de IL-10 e a percentagem de células Treg foram significativamente menores nas gestantes portadoras de PE precoce em comparação aos grupos de PE tardia e de normotensas, sugerindo que tanto o número quanto a função dessa subpopulação estão comprometidas na PE precoce, considerada a forma mais grave de PE. A maior concentração endógena de IL-10, encontrada em gestantes NT em relação às portadoras de PE, observadas no presente estudo, estão de acordo com os achados da literatura (Azizieh et al., 2005; Boreckci et al., 2007; Cristofalo et al., 2013), que demonstraram baixa expressão proteica endógena de IL-10 em células mononucleares de gestantes com PE comparadas com gestantes normotensas. Assim, a maior produção de IL-10 nas gestantes normotensas pode ser explicada pela predominância de um perfil Th2 anti-inflamatório nessas mulheres, que se desenvolve durante a gestação, com predomínio de IL-10 sobre TNF- $\alpha$ , para minimizar os efeitos deletérios de uma resposta inflamatória excessiva.

Em conjunto os resultados do presente estudo demonstram que o balanço entre células Treg e Th17 é deficiente na PE, ocorrendo o desequilíbrio entre perfil inflamatório e anti-inflamatório de subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>, com polarização para os perfis Th1 e Th17. O desvio para o perfil Th17 foi mais evidente nas gestantes com PE precoce, demonstrado por maior percentagem de células RORc e produção elevada de IL-17, associada a níveis significativamente menores de IL-10 e menor percentagem de células Treg. Esse balanço é importante para manter a homeostase e orquestrar a resposta imune durante a gestação. O desequilíbrio também foi comprovado por níveis endógenos elevados de IFN- $\gamma$ , IL-6,

IL-17 e TNF- $\alpha$ , associados com diminuição de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 presentes na circulação de gestantes portadoras de PE.

## **6. CONCLUSÃO**

Assim, esses resultados demonstram que a inflamação sistêmica é uma característica fundamental na PE. Considerando que a adaptação materna à gestação requer uma interação rigidamente controlada entre as imunidades inata e adaptativa, para permitir o crescimento e desenvolvimento normais do semi enxerto fetal, o emprego de agentes moduladores, capazes de controlar essa interação no sentido de se obter sucesso da gestação poderia contribuir para a melhor compreensão do envolvimento da imunidade adaptativa na fisiopatologia da PE.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOG Practice Bulletin no. 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; 99:159–67.
- Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, John S, Lombardi G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2010; 159:120-30.
- Alijotas-Reig J, Llurba E, Gris JM. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: A new challenging role for regulatory T cells. *Placenta* 2014; 35:241–8.
- Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54:30-7.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167:1245-53.
- Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta* 2008; 29:S67–72.
- Barnie PA, Lin X, Liu Y, Xu H, Su Z. IL-17 producing innate lymphoid cells 3 (ILC3) but not Th17 cells might be the potential danger factor for preeclampsia and other pregnancy associated diseases. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:11100-7.
- Barriga C, Rodriguez AB, Ortega E. Increased phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1994; 57:43-6.
- Beckmann I, Efraim SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. *Hypertens Pregnancy* 2004; 23:319-29.
- Borekci B, Aksoy H, Al RA, Demircan B, Kadanali S. Maternal serum interleukin-10, interleukin-2 and interleukin-6 in pre-eclampsia and eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:56-64.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11:309-16.

- Cao W, Wang X, Chen T, Zhu H, Xu W, Zhao S, Cheng X, Xia L. The Expression of Notch/Notch Ligand, IL-35, IL-17, and Th17/Treg in Preeclampsia. *Dis Markers* 2015; 2015:316182.
- Carty DM, Delles C, Dominiczak AF. Preeclampsia and future maternal health. *J Hypertens* 2010; 28:1349-55.
- Cemgil Arikan D, Aral M, Coskun A, Ozer A. Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon- $\gamma$  and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25:1569-73.
- Chen Y, Huang Y, Jiang R, Teng Y. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2012; 119:234-8.
- Cheng SB, Sharma, S. Preeclampsia and health risks later in life: an immunological link. *Semin Immunopathol* 2016; 38:699-708.
- Clausen T, Djurovic S, Reseland JE, Berg K, Drevon CA, Henriksen T. Altered plasma concentrations of leptin, transforming growth factor-beta(1) and plasminogen activator inhibitor type 2 at 18 weeks of gestation in women destined to develop pre-eclampsia. Circulating markers of disturbed placentation? *Placenta* 2002; 23:380–5.
- Conforti-Andreoni C, Spreafico R, Qian HL, Riteau N, Ryffel B, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. *J Immunol* 2011; 187:5842-50.
- Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, Peraçoli MT. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res* 2013; 47: 268-75.
- Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 159:109–19.

- Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:39-45.
- Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2012; 93:75-81.
- De Oliveira LG, Câmara NO, Peraçoli JC, Peraçoli MT, Moron AF, Sass N. sFlt-1 and IP-10 in women with early-onset preeclampsia. *Pregnancy Hypert* 2011; 1:129-31.
- Dekker GA, Sibai BM. The immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol* 1999; 23:24-33.
- Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in perinatology* 2009; 33:130-7.
- Fasshauer M, Waldeyer T, Seeger J, Schrey S, Ebert T, Kratzsch J, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Faber R, Stepan H. "Serum levels of the adipokine visfatin are increased in pre-eclampsia." *Clin endocrine* 2008; 69:69-73.
- Figueiredo AS, Schumacher A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology* 2016; 148:13-21.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330-6.
- Fu B, Tian Z, Wei H. TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia. *Cell Mol Immunol* 2014; 11:564–70.
- Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E, Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:792-7.
- Gharesti-Fard B, Mobasher-Nejad F, Nasri F. The expression of T-helper associated transcription factors and cytokine genes in pre-eclampsia. *Iran J Immunol* 2016; 13:296-308.

- Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF- $\kappa$ B pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol* 2012; 95:67-72.
- Gotsch F, Romero R, Friel L, Kusanovic JP, Espinoza J, Erez O, Than NG, Mittal P, Edwin S, Yoon BH, Kim CJ, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T, Hassan SS. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20:777-92.
- Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv* 2005; 60:807-16.
- Hafeez NA, Fouda Mel-T, Abdel Gawad ER, Assar T, Mansour AI. The role of regulatory T cells in preeclampsia. *Egypt J Immunol* 2014; 21:45-55.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-61.
- Hu D, Chen Y, Zhang W, Wang H, Wang Z, Dong M. Alteration of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T lymphocytes in pregnancy and pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87:190-4.
- Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008; 51:970-5.
- Jianjun Z, Yali H, Zhiqun W, Mingming Z, Xia Z. Imbalance of T-cell transcription factors contributes to the Th1 type immunity predominant in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:38-45.
- Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P, Sooranna SR, Steer PJ. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction? *Br J Obstet Gynaecol* 2002; 109:836-9.
- Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, Tuttle KR, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Mazzali M. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 2003; 41:1183-90.

- Kalinderis M, Papanikolaou A, Kalinderi K, Ioannidou E, Giannoulis C, Karagiannis V, Tarlatzis BC. Elevated Serum Levels of Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$  and Human Chorionic Gonadotropin in Pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2011; 66:468-75.
- Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P, Nakagawa T, Wamsley A, Sheikh-Hamad D, Lan HY, Feng L, Johnson RJ. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 2003; 41:1287–93.
- Khan F, Belch JJ, MacLeod M, Mires G. Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops. *Hypertension* 2005; 46:1123-8.
- 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.
- Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25(+) CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 2000; 12:1145-55.
- Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinform* 2005; 6:62.
- Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A, Van der post JA. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2009; 61:346-59.
- Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol* 2006; 118:268-75.
- Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Preeclampsia. *Lancet* 2016; 387:999-1011.
- Molvarec A, Czeglé I, Szigártó J, Rigó J Jr. Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2015; 112:53-7.

- Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2000; 19:221-31.
- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:S1-22.
- Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195:40-9.
- Orsi NM, Tribe RM. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol* 2008; 20:462-9.
- Ozkan ZS, Simsek M, Ilhan F, Deveci D, Godekmerdan A, Sapmaz E. Plasma IL-17, IL-35, interferon- $\gamma$ , SOCS3 and TGF- $\beta$  levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014; 27:1513-7.
- Paeschke S, Chen F, Horn N, Fotopoulou C, Zambon-Bertoja A, Sollwedel A, Zenclussen ML, Casalis PA, Dudenhausen JW, Volk HD, Zenclussen AC. Preeclampsia is not associated with changes in the levels of regulatory T cells in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54:384-9.
- Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299:1033-6.
- Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010; 129:147-53
- Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2013; 100:129-34.
- Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57:177-85.

- Peraçoli MT, Bannwart CF, Cristofalo R, Borges VT, Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol* 2011; 66:460-7.
- Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983; 4:397-413.
- Prins JR, Boelens Hm, Heimweg J, et al. Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertens Pregnancy* 2009; 28:300–11.
- Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013; 22:8-19.
- Raghupathy R. Manipulation of cytokine production profiles as a therapeutic approach for immunologic pregnancy loss. *Indian J Biochem Biophys* 2008; 45:229-36.
- Rahimzadeh M, Norouzian M, Arabpour F, Naderi N. Regulatory T-cells and preeclampsia: an overview of literature. *Expert Rev Clin Immunol* 2016; 12:209-27.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:499-506.
- Redman CW, Sargent IL. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2007; 76:61-7.
- Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 2000; 21:597-602.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta* 2003; 24:S21-7.
- Redman CW; Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; 308:1592-4.

- Robillard PY. Interest in preeclampsia for researchers in reproduction. *J Reprod Immunol* 2002; 53:279-87.
- Sacks GP, Redman CW, Sargent IL. Monocytes are primed to produce the Th1 type cytokine IL-12 in normal human pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2003; 131:490-7.
- Saifi B, Rezaee SA, Tajik N, et al. Th17 cells and related cytokines in unexplained recurrent spontaneous miscarriage at the implantation window. *Reprod Biomed Online* 2014; 29:481-9.
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:601-10.
- Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2003; 59:161-73.
- Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med* 2007a; 28:192-209.
- Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in fetomaternal tolerance. *Semin Immunopathol* 2007; 29:115-22.
- Saito S. Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. *Immunol Cell Biol* 2010; 88:615-7.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182:18-32.
- Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol* 2009; 183:7023-30.

- Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 2007; 149:139-45.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365:785-99.
- Świst K, Pajtasz-Piasecka E. The influence of transcription factors on CD4+ T cell differentiation. *Postepy Hig Med Dosw* 2011; 65:414-26.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 17; 100:655-69.
- Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol* 2010; 11:59.
- Tarnowska-Madra U, Leibschang J, Kowalska B, Filipp E, Kozar A, Maciejewski T. Levels of immunoreactive cytokines in serum of women with preeclampsia or severe pregnancy hypertension. *Ginekol Pol* 2010; 81:192-6.
- Teles A, Zenclussen AC, Schumacher A. Regulatory T cells are baby,s best friends. *Am J Reprod Immunol* 2013; 69:331-9.
- Toldi G, Saito S, Shima T, Halmos A, Veresh Z, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Molvarec A. The frequency of peripheral blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2012; 68:175-80.
- Tosun M, Celik H, Avcı B, Yavuz E, Alper T, Malatyalioglu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23:880-6.
- Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive

- disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens* 2014; 4:97-104.
- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi, JM. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis and management. *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7: 467-74.
- van Rijn BB, Franx A, Steegers EA, de Groot CJ, Bertina RM, Pasterkamp G, Voorbij HA, Bruinse HW, Roest M. Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS ONE* 2008; 3:e1865.
- Vergati M, Cereda V, Madan RA, Gulley JL, Huen NY, Rogers CJ, et al. Analysis of circulating regulatory T cells in patients with metastatic prostate cancer pre-versus postvaccination. *Cancer immunology immunotherapy* 2011; 60:197-206.
- von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2003; 22:143-8.
- Waldmann H, Graca L, Cobbold S, Adams E, Tone M, Tone Y. Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin Immunol* 2004; 16:119-26.
- Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:883-9.
- 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.
- Xu L, Lee M, Jeyabalan A, Roberts JM. The relationship of hypovitaminosis D and IL-6 in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2014; 210:149 e1-7.
- Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 1997; 272:21597-603.
- Zhang Z, Liu H, Shi Y, Xu N, Wang Y, Li A, Song W. Increased circulating Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2016; 11:1-8.

Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89:587-96.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* 2010; 28:445-89.

A decorative graphic on the left side of the page, featuring a large, stylized letter 'S' or 'C' shape. This shape is composed of elegant, flowing lines and is adorned with small leaves and clusters of tiny dots, creating a delicate, floral-like appearance.

## Capítulo 2


*“Desejo é realização antecipada. Cada um tem hoje o que desejou ontem e terá amanhã o que deseja hoje.*

*Todo desejo, na essência, é uma entidade tomando a forma correspondente. A vida é sempre o resultado de nossa própria escolha”.*

*Chico Xavier*

**Esse capítulo foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista *Immunology*, Impact factor 2016: 4.078.**

## Comprovante de Encaminhamento para Publicação

 Immunology

 Home

 Author

 Review

# Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

---

**Submitted to** Immunology

**Manuscript ID** IMM-2017-4545

**Title** Association between cytokine profile and transcription factors produced by T cells subsets in early and late-onset preeclampsia

**Authors** Ribeiro, Vanessa  
Romao-Veiga, Mariana  
Romagnoli, Graziela  
Matias, Mariana  
Nunes, Priscila  
Borges, Vera  
Peracoli, Jose  
Peracoli, Maria

**Date Submitted** 18-Jan-2017

---

---



**Association between cytokine profile and transcription factors produced by T cells subsets in early and late-onset preeclampsia**

Journal:	<i>Immunology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ribeiro, Vanessa; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Romao-Veiqa, Mariana; Sao Paulo State University, Microbiology and Immunology Romagnoli, Graziela; Sao Paulo State University, Microbiology and Immunology Matias, Mariana; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Nunes, Priscila; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Borques, Vera; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Peracoli, Jose; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Peracoli, Maria; Sao Paulo State University, Microbiology and Immunology
Key Words:	Cytokines, Regulatory T Cells, Reproductive Immunology, T Cells, Transcription Factors

# **Association between cytokine profile and transcription factors produced by T cells subsets in early and late-onset preeclampsia**

Vanessa R. Ribeiro<sup>1</sup>, Mariana Romao-Veiga<sup>2</sup>, Graziela G. Romagnoli<sup>2</sup>, Mariana L. Matias<sup>1</sup>, Priscila R. Nunes<sup>1</sup>, Vera Therezinha M. Borges<sup>1</sup>, Jose C. Peracoli<sup>1</sup>, Maria Terezinha S. Peracoli<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Gynaecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, 18618-970, Botucatu, Sao Paulo, Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University, 18618-691, Botucatu, Sao Paulo, Brazil*

## **Short title: Th17 polarization in early-onset preeclampsia**

**Keywords:** cytokines, regulatory T cells, reproductive immunology, T cells, transcription factors

**\*Corresponding author:** Maria Terezinha Serrao Peracoli, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Rubiao Junior s/n, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, CEP 18618-691 Brazil

Tel: 55 14 38800430

E-mail address: [peracoli@ibb.unesp.br](mailto:peracoli@ibb.unesp.br)

## **Abbreviations**

**APC:**fluorochrome allophycocyanin; **APC-Cy7:**fluorochrome allophycocyanin conjugated to cyanine 7; **BB515:** bright blue fluorochrome 515; **BP:**blood pressure; **cDNA:**complementary DNA; **CD3:** cluster of differentiation 3;**CD4:** cluster of differentiation 4; **CD25:** cluster of differentiation 25; **CD127:** cluster of differentiation 127; **EDTA:**ethylenediamine tetra acetic

acid; **ELISA**:enzyme-linked immunosorbent assay; **FoxP3**: forkhead box P3; **GAPDH**:glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; **GATA-3**: GATA binding protein 3; **IFN- $\gamma$** : interferon gama; **IL**: interleukin; **PE**:fluorochrome phycoerythrin; **PerCP-Cy5.5**:fluorochrome pyridine protein chlorophyll conjugated with cyanine dye; **PE-Cy7**: fluorochrome phycoerythrin conjugated with cyanine dye; **RORc**: retinoic acid-related orphan receptor C; **RPMI**: Roswell Park Memorial Institute; **RT-qPCR**: real-time quantitative polymerase chain reaction; **T-bet**: T box transcription factor; **TGF- $\beta$ 1**: transforming growth factor beta 1; **Th1**: helper T cell 1; **Th2**: helper T cell 2; **Th17**:helper T cell 17; **TNF- $\alpha$** : tumor necrosis factor alpha; **Treg**: regulatory T cell.

## Summary

Preeclampsia (PE) is an obstetric pathology characterized by abnormal activation of the innate and adaptive immune system dependent on the imbalance of T helper subsets. The present study aimed to evaluate the gene and protein expression of Th1/Th2/Th17/Treg T-cell transcription factors in peripheral blood lymphocytes from pregnant women with PE employing RT-qPCR and flow cytometry techniques, as well as the cytokine profile produced by these CD4<sup>+</sup> T cell subsets in the plasma of pregnant women with PE, classified in early-onset PE (n=20), late-onset PE (n=20) and normotensive pregnant women (n=20). Results showed higher percentage of CD4<sup>+</sup> T cells expressing the RORc transcription factor (Th17) and lower percentage of cells expressing FoxP3 (Treg) in women with early-onset PE compared to late-onset PE and normotensive groups. A lower gene expression of GATA-3 transcription factor was detected in cells of early-onset PE compared with late-onset PE group. Endogenous plasma levels of IL-6, IL-17 and TNF- $\alpha$  were significantly higher in early-onset PE group than in late-onset PE and normotensive groups, whereas IL-4 (Th2 profile) and IL-22 (Th17 profile), was not significant different between the studied groups. The endogenous levels of TGF- $\beta$  and IL-10 were significantly lower in the preeclamptic than in normotensive groups of the same gestational age, with a significant difference between early and late-onset PE. The results show that in preeclamptic women there is an imbalance between inflammatory and anti-inflammatory profiles in CD4<sup>+</sup> T cells subsets, with polarization to Th17 profiles in the early-onset PE, considered as the severe form of preeclampsia.

## Introduction

Preeclampsia (PE) is a specific syndrome of human pregnancy that affects 2-10% of women<sup>1</sup> and is responsible for a high proportion of maternal and fetal morbidity and mortality, especially in low and middle income countries.<sup>2,3</sup> The clinical diagnosis is based on the development of hypertension (BP  $\geq$  140 x 90 mmHg) and proteinuria ( $\geq$  300 mg / 24h) that occurs from the 20<sup>th</sup> week of pregnancy.<sup>4</sup> Other maternal dysfunctions are also related to PE, such as renal insufficiency, liver involvement, neurological or hematological complications, utero-placental dysfunction or fetal growth restriction.<sup>5,6</sup>

Clinically, PE is classified as mild or severe, according to patients signs and symptoms<sup>1</sup> and also in early and late-onset PE, depending on whether clinical manifestations occur before or after 34 weeks of gestation, respectively.<sup>7,8</sup> According to Huppertz,<sup>8</sup> early and late-onset PE are two entities that differ in etiology and on disease manifestation. Early-onset PE is associated with placental dysfunction, abnormal uterine and umbilical artery Doppler evaluation, fetuses with growth restriction, intrauterine fetal or maternal complications<sup>9,10</sup> and a higher recurrence rate.<sup>11</sup> On the other hand, late-onset PE is often associated with a normal or slightly increased uterine resistance index, low rate of fetal compromise and more favorable perinatal outcomes.<sup>2,12</sup>

In PE excessive activation of peripheral blood leukocytes is associated with exaggerated innate and adaptive immune responses that may interfere with normal pregnancy progression.<sup>13</sup> This immunological disturbance seems to result from an exacerbated activation of the maternal inflammatory response characterized by overproduction of pro-inflammatory cytokines such as interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )<sup>14-16</sup> and lower concentrations of the regulatory cytokine IL-10 in the circulation or produced endogenously by monocytes from peripheral blood.<sup>17,18</sup>

During the early stages of gestation, a balance is observed in the adaptive immunity cells that comprise CD4<sup>+</sup> T cells, the major population involved in cell-mediated immune response. These cells are activated by antigen-presenting cells and proceed to clonal expansion and cytokine secretion.<sup>19</sup> The cytokine profile secreted at this stage will determine the cell differentiation into any of the several subsets of Th cells and so define the type of immune response generated.<sup>20</sup> Depending on the changes in different cytokine-induced microenvironments CD4<sup>+</sup> T lymphocytes can differentiate into the Th1, Th2, Th17 or Treg subsets performing inflammatory, regulatory or suppressor functions. The generation of Th1 cells occurs in the presence of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-18 which are potent inflammatory mediators for adaptive immune response activation.<sup>21</sup> These cells are characterized by the transcription factor T-bet (T box transcription factor) and expression of IFN- $\gamma$  and IL-2.<sup>22</sup> The presence of IL-4 together with the transcription factor GATA-3 are responsible for differentiating Th2 cells that express a unique set of cytokines, including, IL-4, IL-5 and IL-13.<sup>22</sup> Th17 cells are also a lineage of CD4<sup>+</sup> T cells which are differentiated in the presence of IL-6 and TGF- $\beta$ . Furthermore, these cells are characterized by expressing the transcription factor RORc (retinoic acid-related orphan receptor C) and the cytokine IL-17 production.<sup>23</sup> This subsets plays a critical role on the induction of inflammation and in the pathogenesis of autoimmune diseases and tissue rejection.<sup>22,24</sup> On the other hand, Treg cells, essential for maintaining pregnancy and regulating inflammation, are differentiated in the predominant environment of TGF- $\beta$ <sup>23</sup> together with the transcription factor FoxP3 (Forkhead box P3), the master gene for the differentiation to Treg cells.<sup>25,26</sup> These immune cells express specific anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$ , which dampen an excessive effector immune response.<sup>23,27,28</sup> These factors are activated when a cytokine binds to the specific receptor. In addition to these factors, other DNA binding proteins and epigenetic changes are activated, allowing adequate transcription of genetic information to occur.<sup>29</sup> Thus,

determination of CD4<sup>+</sup> T subsets through their respective transcription factors is important to understand the role of these T cell subsets in several pathologies.

The literature shows that Th subsets, such as Th1, Th2, Th17, and Treg, participated in the pathogenesis and progression of PE, with a predominance of the production of Th1 and Th17 cytokines.<sup>30,31</sup> According to Figueiredo & Schumacher,<sup>23</sup> Th17 and Treg cells form complex and dynamic networks to maintain homeostasis. These cells interact with other cell types to modulate the desired immune response during pregnancy. However, in PE, this complex doesn't occur properly, since there is an imbalance between the inflammatory and anti-inflammatory profile of CD4<sup>+</sup> T subsets.

Darmochwal-Kolarz *et al.* and Santner-Nanan *et al.*<sup>31,32</sup> reported a decrease in regulatory T cells and an increase in Th17 profile cells in the peripheral blood of women with PE compared to normal pregnant women, suggesting that this imbalance is responsible for the activation of the inflammatory response in this pathology.

The activation of innate immunity cells detected in PE results in the production of inflammatory cytokines that activate cells of adaptive immunity, leading to increased inflammation. The aim of this study is to evaluate whether the subsets of CD4<sup>+</sup> T cells (Th1, Th2, Th17 and Treg) and the cytokine profile produced by these cells may differentiate between early and late-onset PE. This knowledge may contribute to a better understanding of the involvement of adaptive immunity in the pathophysiology of this important gestational pathology.

## **Materials and Methods**

### *Subjects*

The study consisted of 60 primiparous women without previous history of hypertension or obstetric and medical complications, admitted to the Obstetric Unit of

Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil between September 2015 and September 2016. Forty women were diagnosed with preeclampsia (PE), defined as a persistent elevated blood pressure value of 140 x 90 mmHg and proteinuria ( $\geq$  300 mg in urine collected during 24 hours) after the 20<sup>th</sup> weeks of gestation.<sup>4</sup> Preeclamptic women were classified according to the onset of clinical manifestations of the disease at moment of diagnosis in early-onset (< 34 weeks of gestation, n=20) and late-onset ( $\geq$  34 weeks of gestation, n=20) preeclampsia, according to the criteria suggested by Huppertz *et al.*<sup>8</sup> A group of 20 normotensive primiparous women with an uncomplicated pregnancy and that remained normotensive (NT) and non-proteinuric until the end of gestation were recruited as controls and matched for gestational age at time of sampling with the preeclamptic group. Gestational age was calculated from the last menstrual period and confirmed by early (<12 weeks gestation) ultrasound examination. Proteinuria in 24-hour urine was measured by a colorimetric method, the Technicon RAXT automation system, in the Clinical Laboratory, Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil. Exclusion criteria included multiple gestation, prior preeclampsia, illicit drug use, and preexisting medical conditions such as diabetes, cancer, chronic hypertension, acute infections disease, cardiovascular, autoimmune, renal and hepatic diseases. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu Medical School (CAAE Protocol number: 43467315.3.0000.5411), and written informed consent was obtained from all women involved in the study. For pregnant women with age bellow 18 years old the written informed consent was obtained from their parents or guardians.

### *Blood sampling*

The whole blood for evaluation of T cell subsets and determination of cytokines from pregnant women with PE was collected at the time of disease diagnosis, and from NT

pregnant women at the time they were matched for gestational age with preeclamptic women. Ten milliliters of blood samples was collected by venipuncture from the antecubital vein and were put into a sterile plastic tube containing 10 U/mL EDTA (Becton Dickinson-BD Vacutainer, Franklin Lakes NJ, USA). After centrifugation for 10 min at 3000 g, the obtained plasma was removed and aliquots were stored at -80°C until the time of cytokine determination.

#### *Isolation of peripheral blood mononuclear cells*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque Premium [density (d) = 1.077] (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) as described previously.<sup>15</sup> The obtained mononuclear cell rich ring was washed twice with RPMI 1640 / HEPES tissue culture medium (LGC Biotechnology, Sao Paulo, SP, Brazil) with centrifugation in between washes at 300 g for 10 min. After this procedure, the cells were resuspended in RPMI 1640 / HEPES culture medium (LGC Biotechnology) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (complete RPMI). For identification of the mononuclear cells, 50 µL of the mononuclear cell suspension were incubated for 10 min at 37°C with 450 µL of 0.02% neutral red solution. The cell concentration was adjusted to  $1 \times 10^6$  viable cells/mL, and the cells were distributed (1 mL/well) in 24-well flat-bottomed plates (Falcon, Corning Incorporated-Life Sciences, Durham, NC, USA) and incubated at 37°C, at 5% CO<sub>2</sub> atmosphere per 90 minutes. Non-adherent cells were obtained by washing the plate wells with RPMI 1640 / HEPES culture medium (LGC Biotechnology). Cell viability as determined by 0.2% Trypan blue dye exclusion was >95% in all experiments. The cell concentration was adjusted to  $2 \times 10^5$  viable cells/mL for T cell subsets characterization by flow cytometry.

*Analysis of the expression of transcription factors in T lymphocytes by flow cytometry*

Expression of intracytoplasmic transcription factors for Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3), Th17 (RORc) and Treg (FoxP3) cells was evaluated soon after blood collection (endogenous expression). The cell concentration was adjusted to  $2 \times 10^5$  cells / mL and cells distributed in Falcon cytometer tubes (BD Biosciences). The cells were incubated with BD Biosciences antibodies, with respective fluorochromes: anti-CD3 (PE-Cy7), anti-CD4 (APC), anti-CD25 (APC-H7) and anti-CD127 (BB515) for 30 min at dark. After centrifugation the cells were washed with wash buffer (BD Biosciences) and centrifuged again at 400 g for 5 min. Then, the cells were fixed and permeabilized using perm buffer (BD Biosciences) for incubation with specific antibodies (BD Biosciences) labeled with specific fluorochromes for the intracellular proteins T-bet (PerCP-Cy5.5), GATA-3 (PE), RORc (PE) and FoxP3 (PE) for 30 min in the dark and at room temperature. For the delineation of the gates, control tubes were incubated with specific isotype antibodies for each fluorochrome (PE-Cy7, APC, APC-H7, BB515, PerCP-Cy5.5 and PE) in each test performed. The gating strategy to analyse Th1, Th2, Th17 and Treg subsets was performed included singlets >debris >lymphocytes-CD3 >T helper lymphocytes-CD4. Additionally, for Treg analysis was performed inside CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup> gate. In the case of the measurements, 30.000 events for each sample were required on a FACSCanto™ II flow cytometer (BD Biosciences) with FACSDIVA software (BD Biosciences). The results were analyzed in the software FlowJo, version vX.10.6 (FlowJo, LLC).

*Evaluation of the expression of transcripts related to transcription factors of CD4<sup>+</sup> T cell subsets by quantitative real-time PCR*

The non-adherent PBMCs were evaluated for the expression of the genes encoding T-bet, GATA-3, RORc and FoxP3 proteins at the transcriptional level. Total RNA was extracted from  $2 \times 10^5$  viable cells using the Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, Canada) according to the manufacturer's protocol, and the Reverse Transcription-coupled polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed as described previously.<sup>33</sup> Briefly, isolated RNA was DNase I Amp Grade (Invitrogen) treated. Subsequently, the synthesis of complementary DNA (cDNA) was conducted using ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System, according to manufacturer's protocol. The RT-qPCR was made using RT GoTaq-qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) and the primer sequences used in this study are listed in Table 1. Each reaction was set in duplicate and the conditions for the RT-qPCR were as follows: initial denaturation at 96°C for 2 min and then 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 60s, followed by a melting curve. Expression values of the analyzed transcripts were normalized to that of the enzyme-encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH). The calculation of the differential expression of selected genes was carried out by the data processing method compared with a standard curve.<sup>34</sup> To analyze relative gene expression, we standardized the RNA expression levels in all samples to that of a single RNA sample, which was set to a value of 100.

**Table 1.** Primers for transcription factors and GAPDH

Gene	Sequence (5'-3')	GeneBank
<b>FoxP3</b>	Forward primer: (614) CAGGAAGGACAGCACCCCTTT (633) Reverse primer: (726) GGAAGTCCTCTGGCTCTTCG (707)	NM_014009
<b>GATA-3</b>	Forward primer: (174) CTCTTCGCTACCCAGGTGAC (193) Reverse primer: (269) ACGACTCTGCAATTCTGCGA (250)	NM_001002295.1
<b>RORc</b>	Forward primer: (363) CATGTCCCGAGATGCTGTCA (382) Reverse primer: (473) GGTTCTGTTGCTGCTGTTG (454)	NM_005060.3
<b>T-bet</b>	Forward primer: (906) GGATGCGCCAGGAAGTTTCA (925) Reverse primer: (993) TGGAGCACAAATCATCTGGGT (974)	NM_013351
<b>GAPDH</b>	Forward primer: (684)CGTGGGAAGGACTCATGACCA(703) Reverse primer:(801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	NM_002046.4

#### *Detection of cytokines related to Th1, Th2, Th17 and Treg subsets by ELISA*

Cytokine concentrations in plasma were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (Th1), IL-4 (Th2), IL-22 and IL-6 (Th17) and IL-10 and TGF- $\beta$ 1 (Treg). Assay sensitivity limits for IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-22, TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  were 15.6 pg/mL, 10 pg/mL, 0.70 pg/mL, 3.9 pg/mL, 0.7 pg/mL, 1.7 pg/mL and 0.5 pg/mL, respectively. A high sensitivity commercial kit obtained from (Affymetrix eBioscience, San Diego, CA, USA) was employed for IL-17 cytokine (Th17) determination with sensitivity limit of 0.01 pg/mL.

#### *Statistical analysis*

The results were evaluated using parametric or non-parametric methods, according to the PRISM statistical program (Graph Prism for Windows, version 6.01, GraphPad, CA, USA). The clinical characteristics of pregnant women were analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by multiple comparisons by Dunn's test. Analysis of the subsets of CD4<sup>+</sup> T cells and cytokines was evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by multiple comparisons by the Tukey's test. The significance level adopted for all the tests was 5% ( $p < 0.05$ ).

## **Results**

### **Clinical characteristics**

There were no differences with respect to maternal age and gestational age between preeclamptic and normotensive pregnant women correspondent groups (Table 2). Systolic and diastolic blood pressures were significantly higher in both preeclamptic groups as compared to the normotensive ones. Proteinuria levels were higher in early-onset PE group than in late-onset and normotensive groups. In preeclamptic women with late-onset PE these values were significantly higher than in normotensive women with the same gestational age.

**Table 2.** Characteristics of preeclamptic pregnant women and normotensive

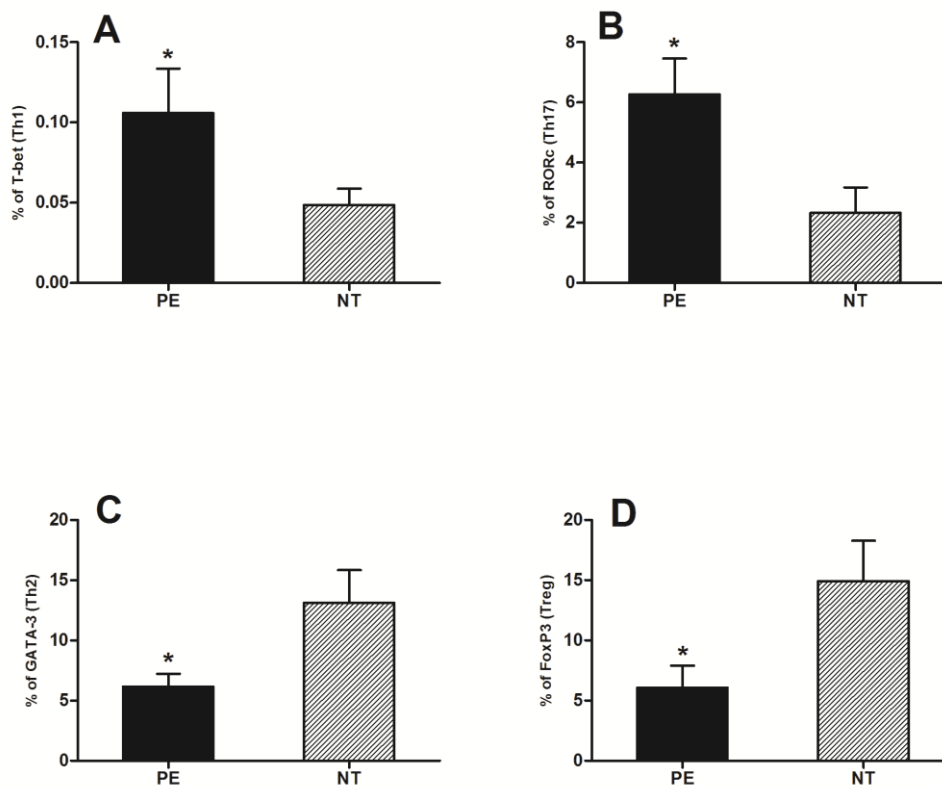
Parameters	Groups			
	Preeclampsia		Normotensive	
	< 34weeks n = 20	≥ 34weeks n = 20	< 34weeks n = 10	≥ 34weeks n = 10
Age (years)	28 (14 – 40)	24 (16 - 43)	25 (18 - 38)	26 (19 – 37)
Gestational age (weeks)	29 (26 – 33)	37 (34 – 40)	30 (26 – 33)	37 (34 – 40)
Systolic blood pressure (mmHg)	160* (140 – 200)	155* (140 – 180)	105 (95 – 110)	100 (95 – 110)
Diastolic blood pressure (mmHg)	110* (90 – 140)	100* (90 – 120)	65 (60 – 70)	60 (60 – 70)
Proteinuria (mg/24 h)	3105# (300 – 26.052)	535+ (300 – 10.800)	<300	<300

Results are expressed as the median (range)

\* ( $p < 0,01$ ) vs NT <34s; NT ≥ 34s; # ( $p < 0,01$ ) vs NT <34s; NT ≥ 34s; PE tardia; + ( $p < 0,05$ ) vs NT ≥ 34s (Kruskal-Wallis test).

### Expression of transcription factors in CD4<sup>+</sup> T cell subsets

The results show the analysis of CD4<sup>+</sup> T cell subsets of inflammatory and anti-inflammatory profiles in the groups of preeclamptic and normotensive pregnant women. Evaluation of the inflammatory profiles showed that, the percentage of cells expressing the T-bet transcription factor, corresponding to the Th1 profile was significantly higher in the PE group than in normotensive group (Fig. 1A). Similar results were observed in relation to Th17 profile represented by significant increase in the percentage of cells expressing RORc (Fig. 1B) in preeclamptic women than in control group. In the anti-inflammatory profiles Th2 and Treg, the percentages of lymphocytes expressing GATA-3 (Fig. 1C) or FoxP3 (Fig. 1D) respectively were significantly lower in the group of women with PE as compared to the normotensive group.



**Figure 1. Expression of transcription factors in CD4<sup>+</sup> T cells subsets.** Percentage of lymphocytes expressing intracellular transcription factors of inflammatory and anti-inflammatory profiles in pregnant women with preeclampsia (PE) and normotensive pregnant women (NT) by flow cytometry. **(A)**% T-bet. **(B)**% RORc. **(C)**% GATA-3. **(D)**% FoxP3. Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT (Student *t* test).

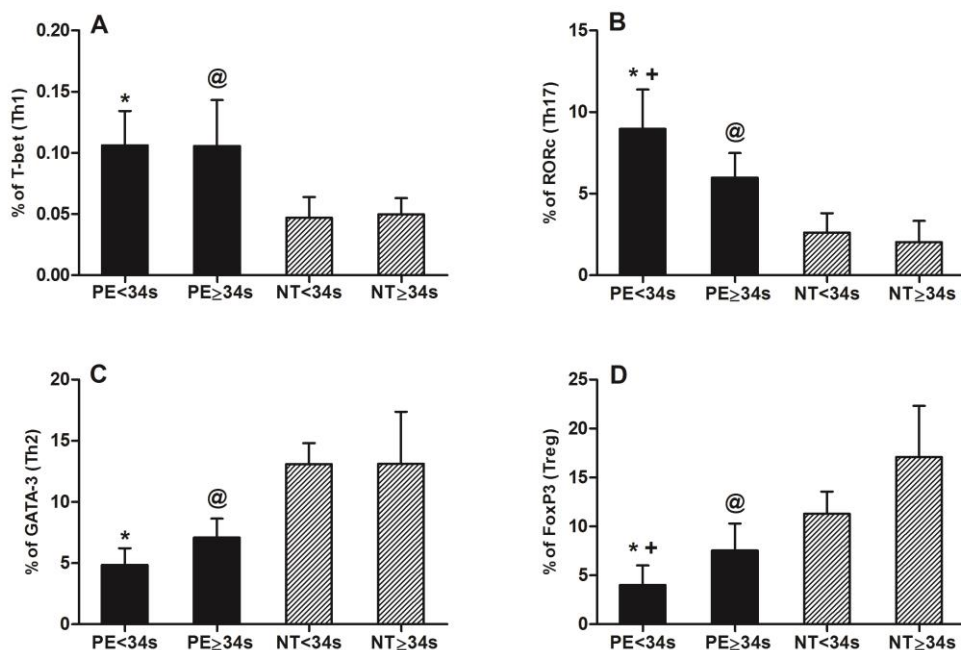
### Th17 profile was increased in the early-onset PE

Th1 and Th17 inflammatory profile was analyzed according to the stratification of pregnant women in early-onset PE (< 34 weeks of gestation) and late-onset PE ( $\geq$  34 weeks of gestation). The percentage of cells expressing T-bet (Fig. 2A) was significantly higher in women with early-onset PE than in normotensive pregnant women with the same gestational age (<34w). Similar results were observed in late-onset PE in relation to the normotensive group with equivalent gestational age ( $\geq$  34w). The population of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>RORc<sup>+</sup>Th17

cells (Fig. 2A) was also significantly higher in early and late-onset PE groups compared to the correspondent normotensive groups with the same gestational age. A significant increase in the percentage of Th17 cells expressing RORc was detected in the early-onset PE group than in the late-onset PE group.

### Th2 and Treg profile was decreased in the early-onset PE

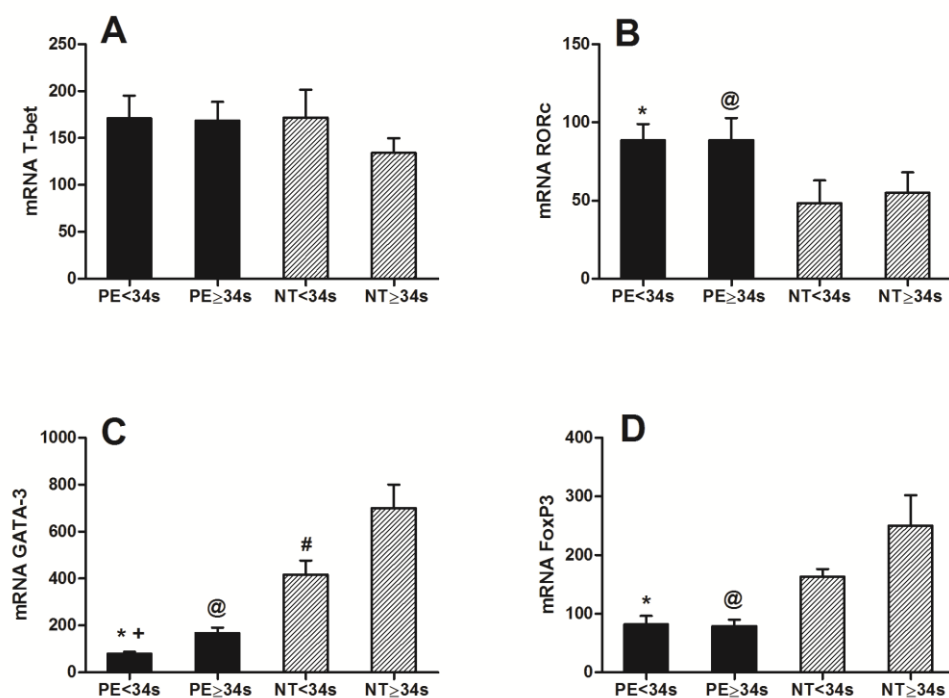
Figure 2C showed that the percentage of lymphocytes expressing GATA-3 were significantly lower in early-onset PE when compared to the normotensive pregnant women with equivalent gestational age. A similar result was observed in the late-onset PE group in relation to the normotensive group with the same gestational age. The population of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup>Treg cells (Fig. 2D) was significantly lower in both early-onset and late-onset PE compared to the corresponding normotensive groups. Comparison between preeclamptic showed a significant decrease in the percentage of Treg cells expressing FoxP3 in the early-onset PE compared to the late-onset PE group (Fig. 2D).



**Figure 2. Expression of transcription factors in CD4<sup>+</sup> T cells subsets.** Percentage of lymphocytes expressing intracellular transcription factors of inflammatory and anti-inflammatory profiles in pregnant women with early-onset preeclampsia (PE <34 weeks of gestation), late-onset preeclampsia (PE ≥34 weeks of gestation) and normotensive pregnant women (NT) with corresponding gestational age by flow cytometry. **(A)**% T-bet. **(B)**% RORc. **(C)**% GATA-3. **(D)**% FoxP3. Results expressed as mean ± SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT <34s; @ ( $p < 0,05$ ) vs. NT ≥ 34s; + ( $p < 0,05$ ) vs. PE ≥ 34s (ANOVA).

### **Expression of genes related to transcription factors of CD4<sup>+</sup> T cell subsets**

No significant differences were detected in the gene expression of T-bet in pregnant women with early and late-onset PE compared to normotensive pregnant women with equivalent gestational age (Fig. 3A). However, higher mRNA levels of RORc were observed in the early-onset and late-onset PE groups than in the normotensive ones with corresponding gestational age. A significant decrease in gene expression of GATA-3 (Fig. 3C) and FoxP3 (Fig. 3D) was detected in lymphocytes from early-onset PE as well as late-onset PE groups compared to the normotensive groups with the same gestational age. The levels of GATA-3 mRNA were significantly lower in early-onset PE than in late-onset PE. Comparison between normotensive groups showed significant differences between normotensive group with gestational age <34 weeks and with gestational age ≥34 weeks (Fig. 3C).



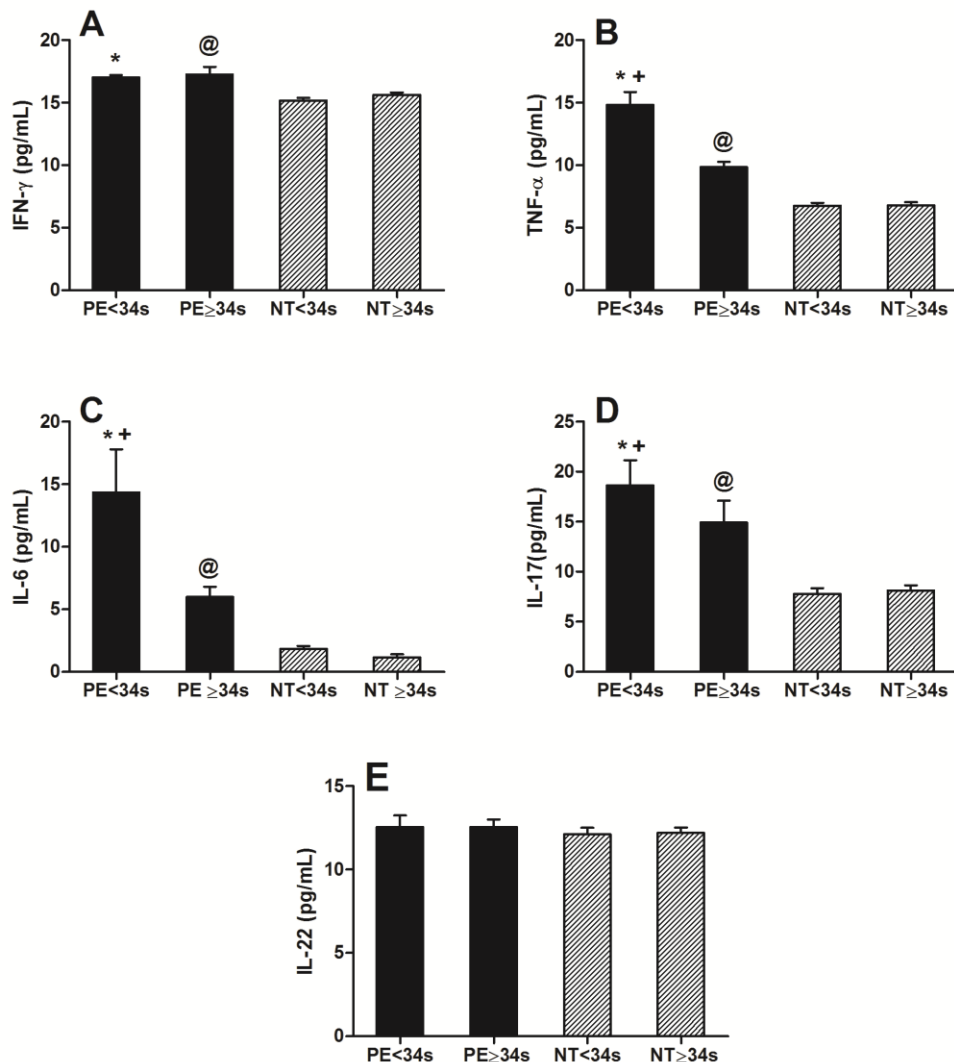
**Figure 3. Transcription factors mRNA of pro-inflammatory and anti-inflammatory profiles.** Gene expression of T-bet (A), RORc (B), GATA-3 (C) and FoxP3 (D) in PBMCs obtained from pregnant women with early-onset preeclampsia (PE <34 weeks of gestation), late-onset preeclampsia (PE ≥34 weeks of gestation) and normotensive pregnant women (NT) with corresponding gestational age by RT-qPCR. Results expressed as mean ± SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT <34s; @ ( $p < 0,05$ ) vs. NT ≥ 34s; + ( $p < 0,05$ ) vs. PE ≥ 34s; # ( $p < 0,05$ ) vs. NT ≥ 34s (ANOVA).

### Cytokines determination

The plasmatic concentrations of IFN- $\gamma$  (Fig. 4A), TNF- $\alpha$  (Fig. 4B) IL-6 (Fig. 4C) and IL-17 (Fig. 4D) were significantly higher in preeclamptic women than in the normotensive groups with the corresponding gestational age. When the two groups of early-onset and late-onset PE were compared TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-17 levels were significantly higher in the early-onset PE

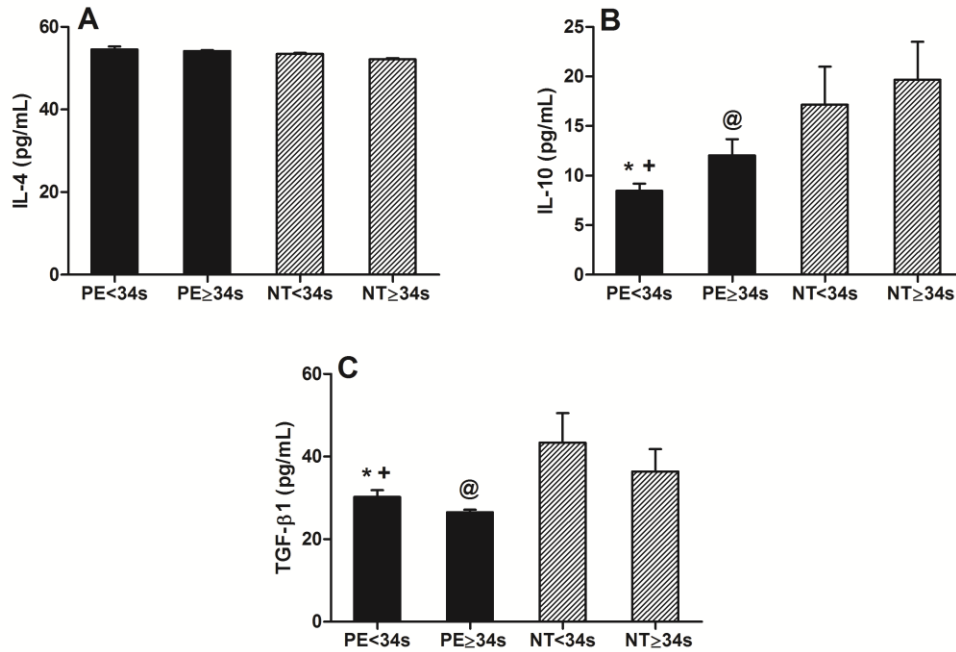
group. The plasma IL-22 (Fig. 4E) and IL-4 (Fig. 5A) levels showed no significant differences between normotensive and preeclamptic groups.

Endogenous levels of IL-10 (Fig. 5B) and TGF- $\beta$ 1 (Fig. 5C) were significantly lower in early-onset and late-onset PE groups than in normotensive ones with corresponding gestational age. Evaluation between preeclamptic groups showed respectively lower IL-10 (Fig. 5B) and higher TGF- $\beta$ 1 (Fig. 5C) concentrations in early-onset PE. There were no differences between normotensive groups in relation to the all cytokines evaluated.



**Figure 4. Pro-inflammatory cytokine profile.** Protein expression of IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), IL-17 (D) e IL-22 (E) in plasma obtained from pregnant women with early-onset preeclampsia (PE <34 weeks of gestation), late-onset preeclampsia (PE  $\geq$ 34 weeks of

gestation) and normotensive pregnant women (NT) with corresponding gestational age by ELISA. Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT <34s; @ ( $p < 0,05$ ) vs. NT  $\geq$  34s; + ( $p < 0,05$ ) vs. PE  $\geq$  34s (ANOVA).



**Figure 5. Anti-inflammatory cytokine profile.** Protein expression of IL-4 (A), IL-10 (B) e TGF- $\beta$ 1 (C) in plasma obtained from pregnant women with early-onset preeclampsia (PE <34 weeks of gestation), late-onset preeclampsia (PE  $\geq$ 34 weeks of gestation) and normotensive pregnant women (NT) with corresponding gestational age by ELISA. Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT <34s; @ ( $p < 0,05$ ) vs. NT  $\geq$  34s; + ( $p < 0,05$ ) vs. PE  $\geq$  34s (ANOVA).

## Discussion

The present study characterized the subsets of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (Th1, Th2, Th17 and Treg) and the cytokine profile produced by these cells in the peripheral blood of pregnant women with PE. The results demonstrated that lymphocytes are endogenously polarized to

the Th1 and Th17 inflammatory profiles and show a decrease in Th2/Treg anti-inflammatory profiles. In addition, increased production of the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 and TNF- $\alpha$  as well as decreased levels of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$ 1 were found. These results confirm previous evidence of exacerbated activation of circulating leukocytes in these patients<sup>14,15,35</sup> and agree with reports that showed a decrease in the proportion of circulating Treg cells and an increase in Th17 cells.<sup>31,32,36-39</sup>

In PE, T helper cell subsets were evaluated by gene expression of transcription factors for these cells,<sup>27,40</sup> or by the protein expression of these factors.<sup>31,32,38</sup> In the present study, the gene and protein expression of Th1/Th2/Th17/Treg specific transcription factors in peripheral blood lymphocytes from pregnant women with PE were determined, using RT-qPCR and flow cytometry techniques, respectively, as well as the cytokine profile produced by these CD4<sup>+</sup> T cell subsets in the plasma of pregnant women with PE. Increased Th1/Th17 inflammatory profiles and decreased Th2/Treg anti-inflammatory profiles in preeclamptic women showed imbalance between CD4<sup>+</sup> T lymphocytes subsets, evidenced by increased gene and protein expression of T-bet and RORc intracytoplasmic transcription factors and by lower gene and protein expression of GATA-3 and FoxP3 in preeclamptic women. Recently, Gharesi-Fard *et al.*<sup>41</sup> evaluated the gene expression of these transcription factors in decidua and chorionic villi of placentas from pregnant women with PE and normal pregnant women by RT-PCR. The authors detected a decrease in expression of FoxP3 and GATA-3 and increase of T-bet in the decidua, while in the chorionic samples FoxP3 expression was decreased and RORc increased. The similarity between our results and those of these authors suggests that the imbalance of these subsets in the placenta is also observed in the circulating cells of preeclamptic women.

Studies on Th17 cells involved in the pathogenesis of PE detected an increase in the percentage of these cells in the peripheral blood of patients with severe PE compared with

healthy pregnant women, suggesting that hyper-regulation of Th17 immunity may contribute to the development of severe cases of PE.<sup>31</sup> On the other hand, Treg cells are considered to play a crucial role in the implantation of embryos and the maintenance of maternal immune tolerance to the fetus.<sup>42</sup> Zhang *et al.*<sup>43</sup> demonstrated that the percentage of Treg cells defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> was significantly lower in patients with severe PE compared to healthy pregnant women. Thus, this reduction of Treg cells may interrupt maternal immunological tolerance, contributing to the occurrence of PE.

When pregnant women with PE were classified according to the onset of the clinical manifestations of PE, we found that pregnant women with early-onset PE showed higher percentage of CD4<sup>+</sup> T cells expressing the RORc transcription factor and a significant decrease in the percentage of Treg cells expressing FoxP3 in relation to the late-onset PE group, thus confirming the severity of the disease before the 34<sup>th</sup> week of gestation. This Treg/Th17 imbalance may be responsible for the activation of the exacerbated inflammatory response that is more prominent in early-onset than in late-onset PE.<sup>18</sup>

There were no differences between the groups of preeclamptic women regarding to the gene expression of T-bet, FoxP3 and RORc, although GATA-3 expression was lower in pregnant women with early-onset PE. These results suggest that the evaluation of the percentage of these subsets using flow cytometry and the determination of the cytokine profile by ELISA were the most sensitive and adequate techniques to discriminate pregnant women with early-onset than late-onset PE in relation to the involvement of adaptive immunity in the disease pathogenesis.

Our study evaluating the specific cytokines of each T cell subset profile in plasma of pregnant women with PE confirms these cells polarization to an inflammatory profile. Thus, high endogenous production of the inflammatory cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-17 was observed, as well as lower production of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$ 1

detected in plasma of pregnant women with PE. The increased levels of IFN- $\gamma$  produced by preeclamptic women corroborate with the results of other authors who detected significant increase of this cytokine in plasma of pregnant women with PE compared to normotensive pregnant women.<sup>44,45</sup>

Plasma levels of TNF- $\alpha$  were significantly increased in early-onset PE than in late-onset PE and confirms previous results obtained in our laboratory.<sup>18</sup> The higher endogenous production of TNF- $\alpha$  in pregnant women with PE is in accordance to the literature<sup>15,46,47</sup> and suggests that the deleterious effects of high TNF- $\alpha$  circulating concentrations may be associated with the most severe manifestations of PE and with the oxidative stress present in this pathology. It is noteworthy that in the blood of pregnant women with PE there is an exacerbated cytotoxic activity accompanied by an increase in the levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6,<sup>48</sup> in addition to IFN- $\gamma$  and IL-17.<sup>31,44</sup>

T cells naïve stimulated with TGF- $\beta$  and IL-6 develop a Th17 response, with expression of IL-17 and IL-22 and are responsible for autoimmunity and gestation loss.<sup>23,28</sup> According to our findings, it was evident that pregnant women with early-onset PE, considered the most severe form of PE, comprised a higher percentage of Th17 cells in the peripheral blood and also significantly higher levels of IL-17 compared to late-onset PE and normotensive women of the similar gestational age. These results agree with recent studies showing an increase in circulating levels of IL-17 in pregnant women with PE when compared to healthy pregnant women and non-pregnant women<sup>49</sup> and higher IL-17 concentration in plasma of pregnant women with severe PE.<sup>43</sup> Considering that pregnant women with early-onset PE develop more severe clinical manifestations than pregnant women with late-onset PE, leading to the excessive systemic inflammatory response characteristic of PE, the high levels of IL-17 produced by Th17 cells may cooperate with other immune

mediators to aggravate the inflammation of placental blood vessels, thus contributing to the development of PE.<sup>31</sup>

In the present study, the higher levels of IL-6 in pregnant women with early-onset PE compared to the late-onset PE and normotensive groups confirmed data from the literature showing the polarization to the Th17 inflammatory profile through the IL-6 and TGF- $\beta$  axis.<sup>50</sup> This shift to Th17 was more evident in pregnant women with early-onset PE that shows more intense inflammatory state than in women with late-onset PE.<sup>18</sup> The decrease in Th2/Treg anti-inflammatory profile in preeclamptic women could be explained by the predominant inflammatory cytokine environment in these pregnant women. Since IL-1 $\beta$  and IL-6 can induce the development of Th17 from the common ancestral cell of Th17 and Tregs<sup>51,52</sup> it can be assumed that in PE higher concentrations of these cytokines may direct the differentiation of Tregs to Th17 cells.<sup>53</sup>

The decreased levels of TGF- $\beta$ 1 in preeclamptic women compared to increased levels in normotensive pregnant women corroborate with the literature<sup>54</sup> showing that the polarization of CD4<sup>+</sup> T cells to Treg requires environment with high levels of TGF- $\beta$ .<sup>23</sup> Therefore, the Treg profile may be decreased in PE due to the high concentrations of IL-6 produced by cells of innate immunity in pregnant women with PE.<sup>14</sup> As IL-6 secretion suppresses the protective immunoregulatory properties of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells<sup>55</sup> it is possible that increased levels of IL-6 may regulate Treg cell expansion in this syndrome.<sup>53</sup> Although TGF- $\beta$ 1 levels were decreased in pregnant women with PE compared to normotensive ones, they were higher in early-onset PE than in late-onset PE, suggesting that the association between higher concentration of IL-6 and TGF- $\beta$ 1 levels could polarize T cells to Th17 profile, with higher production of IL-17 in the early-onset PE group.

The concentration of IL-4 in the plasma of preeclamptic women did not show significant difference when compared to the normotensive groups, corroborating the results of

other authors.<sup>48,56</sup> Similarly IL-22 concentrations were not different between the groups studied. Although Zhang *et al.*<sup>43</sup> have reported a significant increase in plasma IL-22 levels in pregnant women with severe PE compared with the control group, we consider that the role of IL-22 in PE needs to be better studied.

Plasma levels of IL-10 and the percentage of Treg cells were significantly lower in pregnant women with early-onset PE than in the late-onset PE and normotensive groups, suggesting that both the number and function of this CD4<sup>+</sup> subset is impaired in early-onset PE. The highest endogenous concentration of IL-10 detected in plasma of normotensive pregnant women compared with preeclamptic groups is in accordance to the findings of the literature.<sup>17,57,58</sup> Thus, the higher production of IL-10 in normotensive pregnant women can be explained by the predominance of an anti-inflammatory Th2 profile in these women, which develop during pregnancy, with predominance of IL-10 over TNF- $\alpha$ , to minimize deleterious effects of an excessive inflammatory response.

Together, the results of the present study demonstrate that the balance between Treg and Th17 cells is deficient in PE, with an imbalance between the inflammatory and anti-inflammatory profiles of CD4<sup>+</sup> T cells, with polarization to the Th1 and Th17 profiles. Deviation to the Th17 profile was more evident in pregnant women with early-onset PE, demonstrated by a higher percentage of RORc cells and elevated IL-17 production, associated with significantly lower levels of IL-10 and a lower percentage of Treg cells. According to Figueiredo & Schumacher,<sup>23</sup> the balance Treg/Th17 is important to maintain homeostasis and orchestrate the immune response during gestation. Considering that maternal adaptation to gestation requires a rigidly controlled interaction between innate and adaptive immunities to allow normal growth and development of the fetal half-graft,<sup>59</sup> the use of agents capable of modulating this interaction might lead to pregnancy success and contribute to a better understanding of the involvement of adaptive immunity in the pathophysiology of PE.

## **Acknowledgement**

This work was supported by the Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil, FAPESP, (Grant No 2012/24697-8 and 2014/25124-7). The authors thank the staff of the hospitals and the women who participated in this study.

## **Author contributions**

VRR, MRV, GGR, MLM and PRN performed experiments. VTB and JCP selected pregnant women for the study. VRR, MRV and MTSP conceived the ideas, designed experiments, analyzed data and prepared the manuscript.

## **Conflicts of Interest**

The authors state that they have no financial or commercial conflicts of interest.

## **References**

1. ACOG Practice Bulletin no. 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; **99**:159–67.
2. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; **365**:785-99.
3. Ghulmiyyah L, Sibai B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin Perinatol* 2012; **36**:56–9.
4. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; **183**:S1-S22.
5. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W *et al.* The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens* 2014; **4**:97-104.

6. Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet* 2016; **387**:999-1011.
7. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2003; **22**:143-8.
8. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008; **51**:970-5.
9. Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2000; **19**:221-31.
10. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2006; **195**:40-9.
11. Redman CW; Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; **308**:1592-4.
12. Raymond D, Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv* 2011; **66**:497-506.
13. Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A *et al.* Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2009; **61**:346-59.
14. Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol* 2006; **118**:268-75.
15. Peraçoli MT, Bannwart CF, Cristofalo R, Borges VT, Costa RA, Witkin SS *et al.* Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol* 2011; **66**:460-7.
16. Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013; **22**:8-19.
17. Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS *et al.* Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res* 2013; **47**:268-75.

18. Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT *et al.* High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2013; **100**:129-34.
19. Li W, Li B, Fan W, Geng L, Li X, Li L *et al.* CTLA4 Ig gene transfer alleviates abortion in mice by expanding CD4+CD25+ regulatory T cells and inducing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Reprod Immunol* 2009; **80**:1–11.
20. Jimeno R, Leceta J, Garin M, Ortiz AM, Mellado M, Rodriguez-Frade JM *et al.* Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect. *J Leukoc Biol* 2015; **98**:257–69.
21. Conforti-Andreoni C, Spreafico R, Qian HL, Riteau N, Ryffel B, Ricciardi-Castagnoli P *et al.* Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. *J Immunol* 2011; **187**:5842-50.
22. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010; **129**:147-53.
23. Figueiredo AS, Schumacher A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology* 2016; **148**:13-21.
24. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010; **159**:109–19.
25. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; **4**:330-6.
26. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; **299**:1057-61.
27. Jianjun Z, Yali H, Zhiqun W, Mingming Z, Xia Z. Imbalance of T-cell transcription factors contributes to the Th1 type immunity predominant in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2010; **63**:38-45.
28. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; **63**:601-10.

29. Świst K, Pajtasz-Piasecka E. The influence of transcription factors on CD4+ T cell differentiation. *Postepy Hig Med Dosw* 2011; **65**:414-26.
30. Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2003; **59**:161-73.
31. Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B *et al.* The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2012; **93**:75-81.
32. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B *et al.* Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol* 2009; **183**:7023-30.
33. Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT *et al.* Endogenous and Uric Acid-Induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia. *PLoS One*. 2015; **10**:e0129095.
34. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 2005; **6**:62.
35. Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E *et al.* Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; **185**:792-7.
36. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T *et al.* Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 2007; **149**:139-45.
37. Prins JR, Boelens Hm, Heimweg J, Van der Heide S, Dubois AE, Van Oosterhout AJ *et al.* Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertens Pregnancy* 2009; **28**:300–11.
38. Toldi G, Saito S, Shima T, Halmos A, Veresh Z, Vászrhelyi B *et al.* The frequency of peripheral blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2012; **68**:175-80.
39. Hafeez NA, Fouda Mel-T, Abdel Gawad ER, Assar T, Mansour AI. The role of regulatory T cells in preeclampsia. *Egypt J Immunol* 2014; **21**:45-55.

40. Cao W, Wang X, Chen T, Zhu H, Xu W, Zhao S *et al.* The Expression of Notch/Notch Ligand, IL-35, IL-17, and Th17/Treg in Preeclampsia. *Dis Markers* 2015; **2015**:316182.
41. Gharesi-Fard B, Mobasher-Nejad F, Nasri F. The Expression of T-Helper Associated Transcription Factors and Cytokine Genes in Pre-Eclampsia. *Iran J Immunol* 2016; 13:296-308.
42. Aljotas-Reig J, Llorba E, Gris JM. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: A new challenging role for regulatory T cells. *Placenta* 2014; **35**:241–8.
43. Zhang Z, Liu H, Shi Y, Xu N, Wang Y, Li A *et al.* Increased circulating Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2016; **11**:1-8.
44. Ozkan ZS, Simsek M, Ilhan F, Deveci D, Godekmerdan A, Sapmaz E. Plasma IL-17, IL-35, interferon- $\gamma$ , SOCS3 and TGF- $\beta$  levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014; **27**:1513-7.
45. Barnie PA, Lin X, Liu Y, Xu H, Su Z. IL-17 producing innate lymphoid cells 3 (ILC3) but not Th17 cells might be the potential danger factor for preeclampsia and other pregnancy associated diseases. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; **8**:11100-7.
46. Beckmann I, Efraim SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. *Hypertens Pregnancy* 2004; **23**:319-29.
47. Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; **57**:177-85.
48. Tarnowska-Madra U, Leibschang J, Kowalska B, Filipp E, Kozar A, Maciejewski T. Levels of cytokines in serum of women with preeclampsia or severe pregnancy hypertension. *Ginekol Pol* 2010; **81**:192-6.
49. Molvarec A, Czegle I, Sziujártó J, Rigó J Jr. Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2015; **112**:53-7.
50. Xu L, Lee M, Jeyabalan A, Roberts JM. The relationship of hypovitaminosis D and IL-6 in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2014; **210**:149.
51. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:883-9.

52. Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, John S, Lombardi G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2010; **159**:120-30.
53. Rahimzadeh M, Norouzian M, Arabpour F, Naderi N. Regulatory T-cells and preeclampsia: an overview of literature. *Expert Rev Clin Immunol* 2016; **12**:209-27.
54. Clausen T, Djurovic S, Reseland JE, Berg K, Drevon CA, Henriksen T. Altered plasma concentrations of leptin, transforming growth factor-beta(1) and plasminogen activator inhibitor type 2 at 18 weeks of gestation in women destined to develop pre-eclampsia. Circulating markers of disturbed placentation? *Placenta* 2002; **23**:380-5.
55. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; **299**:1033-6.
56. Cemgil Arıkan D, Aral M, Coskun A, Ozer A. Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon- $\gamma$  and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; **25**:1569-73.
57. Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2005; **54**:30-7.
58. Borekci B, Aksoy H, Al RA, Demircan B, Kadanali S. Maternal serum interleukin-10, interleukin-2 and interleukin-6 in pre-eclampsia and eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; **58**:56-64.
59. van Rijn BB, Franx A, Steegers EA, de Groot CJ, Bertina RM, Pasterkamp G *et al*. Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS One* 2008; **3**:e1865.

## Figure Legends

**Figure 1. Expression of transcription factors in CD4<sup>+</sup> T cells subsets.** Percentage of lymphocytes expressing intracellular transcription factors of inflammatory and anti-inflammatory profiles in pregnant women with preeclampsia (PE) and normotensive pregnant women (NT) by flow cytometry. **(A)**% T-bet. **(B)**% RORc. **(C)**% GATA-3. **(D)**% FoxP3. Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT (Student *t* test).

**Figure 2. Expression of transcription factors in CD4<sup>+</sup> T cells subsets.** Percentage of lymphocytes expressing intracellular transcription factors of inflammatory and anti-inflammatory profiles in pregnant women with early-onset preeclampsia (PE <34 weeks of gestation), late-onset preeclampsia (PE  $\geq$ 34 weeks of gestation) and normotensive pregnant women (NT) with corresponding gestational age by flow cytometry. **(A)**% T-bet. **(B)**% RORc. **(C)**% GATA-3. **(D)**% FoxP3. Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT <34s; @ ( $p < 0,05$ ) vs. NT  $\geq$  34s; + ( $p < 0,05$ ) vs. PE  $\geq$  34s (ANOVA).

**Figure 3. Transcription factors mRNA of pro-inflammatory and anti-inflammatory profiles.** Gene expression of T-bet **(A)**, RORc **(B)**, GATA-3 **(C)** and FoxP3 **(D)** in PBMCs obtained from pregnant women with early-onset preeclampsia (PE <34 weeks of gestation), late-onset preeclampsia (PE  $\geq$ 34 weeks of gestation) and normotensive pregnant women (NT) with corresponding gestational age by RT-qPCR. Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT <34s; @ ( $p < 0,05$ ) vs. NT  $\geq$  34s; + ( $p < 0,05$ ) vs. PE  $\geq$  34s; # ( $p < 0,05$ ) vs. NT  $\geq$  34s (ANOVA).

**Figure 4. Pro-inflammatory cytokine profile.** Protein expression of IFN- $\gamma$  **(A)**, TNF- $\alpha$  **(B)**, IL-6 **(C)**, IL-17 **(D)** e IL-22 **(E)** in plasma obtained from pregnant women with early-onset preeclampsia (PE <34 weeks of gestation), late-onset preeclampsia (PE  $\geq$ 34 weeks of gestation) and normotensive pregnant women (NT) with corresponding gestational age by

ELISA. Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT  $< 34s$ ; @ ( $p < 0,05$ ) vs. NT  $\geq 34s$ ; + ( $p < 0,05$ ) vs. PE  $\geq 34s$  (ANOVA).

**Figure 5. Anti-inflammatory cytokine profile.** Protein expression of IL-4 (A), IL-10 (B) e TGF- $\beta$ 1 (C) in plasma obtained from pregnant women with early-onset preeclampsia (PE  $< 34$  weeks of gestation), late-onset preeclampsia (PE  $\geq 34$  weeks of gestation) and normotensive pregnant women (NT) with corresponding gestational age by ELISA. Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs. NT  $< 34s$ ; @ ( $p < 0,05$ ) vs. NT  $\geq 34s$ ; + ( $p < 0,05$ ) vs. PE  $\geq 34s$  (ANOVA).



*Anexos*

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo 1

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

##### “ASSOCIAÇÃO ENTRE PERFIL DE CITOCINAS E FATORES DE TRANSCRIÇÃO PRODUZIDOS POR SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T NA PRÉ-ECLÂMPZIA PRECOCE E TARDIA “

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

Assim, concordo em participar da pesquisa.

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

Botucatu, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário maior de 18 anos

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura da adolescente maior de 11 anos

#### **Pesquisadores:**

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

Vanessa Rocha Ribeiro – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP. Fone: (14)3880-0431

## 8.2 Anexo 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

#### “ASSOCIAÇÃO ENTRE PERFIL DE CITOCINAS E FATORES DE TRANSCRIÇÃO PRODUZIDOS POR SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T NA PRÉ-ECLÂMPسيا PRECOCE E TARDIA “

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

Assim, concordo em participar da pesquisa.

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

Botucatu, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário maior de 18 anos

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura da adolescente maior de 11 anos

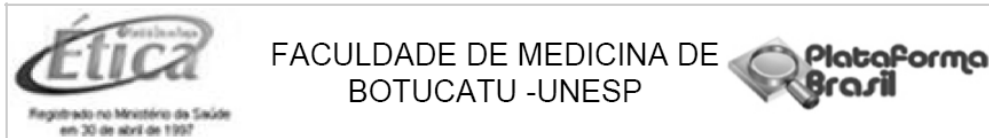
#### Pesquisadores:

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

Vanessa Rocha Ribeiro- Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu– UNESP. Fone: (14)3880-0431

## 8.3 Anexo 3

### Parecer do Conselho de Ética em Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Associação entre perfil de citocinas e fatores de transcrição produzidos por subpopulações de células T na pré-eclâmpsia precoce e tardia

**Pesquisador:** Vanessa Rocha Ribeiro

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

**Versão:** 1

**CAAE:** 43467315.3.0000.5411

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.047.289

**Data da Relatoria:** 04/05/2015

##### Apresentação do Projeto:

A pré-eclâmpsia é uma condição hipertensiva que acomete gestantes e está associada a mortalidade materna e fetal. Acredita-se que ela se deva à ativação anormal do sistema imune. Tendo por base essa hipótese, propõe-se estudo para avaliar o perfil de produção de citocinas e as subpopulações de linfócitos T envolvidas na pré-eclâmpsia. Serão incluídas 40 gestantes com pré-eclâmpsia e 20 gestantes sadias. Há vários critérios de exclusão, entre eles a gestação gemelar e a doença hipertensiva prévia à gestação - além de várias comorbidades. As pesquisadoras recrutarão as gestantes no serviço de obstetria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Realizarão então a caracterização do quadro (em relação à semana de gestação, sintomas, etc) e colherão exames: (a) urina de 24 horas para aferir proteinúria; (b) sangue (10ml), com o qual serão realizadas diversas análises, entre elas a dosagem de citocinas séricas, a contagem de subpopulações de linfócitos T e a análise de fatores de transcrição em células mononucleares. O estudo tem delineamento transversal, e portanto os dados e exames serão coletados em um único momento.

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

Continuação do Parecer: 1.047.289

**Objetivo da Pesquisa:**

Caracterizar subpopulações de células T e o perfil de citocinas produzido por essas células, em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, com a finalidade de compreender as alterações imunológicas que acompanham essa condição.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são pequenos, pois envolvem somente coleta de sangue e urina. No TCLE consta que as gestantes não serão abordadas em momentos constrangedores ou em que apresentem dor/desconforto. Isso minimiza riscos. Não há benefícios diretos, mas o conhecimento obtido com o estudo poderá colaborar para melhor compreensão e manejo da pré-eclâmpsia.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de projeto sobre tema relevante e factível nas condições em que se propõe.

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

Apresentam-se os termos pertinentes. O TCLE não está escrito em forma de convite, porém foi redigido em linguagem simples e é claro quanto aos objetivos, operacionalização, riscos e benefícios do estudo.

**Recomendações:**

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

Recomendo aprovação sem necessidade de envio à CONEP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 04 de maio de 2.015, sem necessidade de envio à CONEP.

Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste estudo. OBS: Essa documentação deverá ser enviada na Plataforma Brasil através de "NOTIFICAÇÃO".



FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 1.047.289

BOTUCATU, 04 de Maio de 2015

---

Assinado por:  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

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

Página 03 de 03