UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

MARIANA LETICIA MATIAS

ANÁLISE DE INFLAMASSOMA INDUZIDO POR URATO MONOSSÓDICO EM MONÓCITOS DE GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPSIA

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: Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Gustavo de Oliveira

Botucatu
2015

MARIANA LETICIA MATIAS

ANÁLISE DE INFLAMASSOMA INDUZIDO POR URATO MONOSSÓDICO EM MONÓCITOS DE GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPSIA

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: Profa.Dra.Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Coorientador:Prof.Dr.Leandro Gustavo de Oliveira

Botucatu
2015

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

Matias, Mariana Leticia.
Análise de inflamassoma induzido por urato monossódico em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Mariana Leticia Matias. - Botucatu, 2015

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

1. Pré-eclâmpsia. 2. Citocinas. 3.Monócitos. 4. Mulheres grávidas. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: Citocinas; Inflamassoma; Monócitos; Pré-eclâmpsia.

Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP - Botucatu e no laboratório do Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Immunology and Infectious Diseases, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processos nº 2012/21287-3 e 2014/00693-9.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, José Carlos e Elisabete, por todo amor e confiança que sempre tiveram por mim. Não sei se conseguirei retribuir tudo o que fizeram por mim, mas minha gratidão vocês terão para sempre. Vocês serão sempre meu alicerce e exemplo de luta e dedicação. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por toda sabedoria e atenção. A senhora é uma grande profissional e será sempre meu exemplo. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, Carlos e Zilda, que são a base da minha família e que sempre me apoiaram em todas as etapas de minha vida.

Ao meu querido irmão Maurício, pelo apoio que sempre meu deu.

Ao meu namorado Gustavo, por todo carinho, atenção e companheirismo. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos meus amigos do Lab. 3, Vanessa, Priscila, Célio e Ingrid, por toda a ajuda e momentos de descontração.

À minha cunhada e amiga Mariana, agradeço por toda a paciência que teve comigo e por estar sempre disposta a me ajudar em tudo. Você também é um grande exemplo para mim!

Às minhas amigas da República Alcoolchego, Piu, Nendi, Kiss, Comi e Odi, pela grande amizade e por todos os momentos de alegria.

Ao prof. Steven Sol Witkin, pela oportunidade de realizar um projeto em seu laboratório no Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Immunology and Infectious Diseases, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA.

Ao prof. João Pessoa Araújo Júnior do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por disponibilizar seu laboratório e colaborar com o andamento de meu trabalho.

Ao Dr. Peraçoli, Dr. Leandro, Dra. Vera, Dr. Roberto e aos demais docentes e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por sempre estarem disponíveis a me ajudar.

Aos funcionários da Unidade Básica de Saúde do Jardim Iolanda, Botucatu, sempre prontas a ajudar.

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 pela disposição e eficiência em todas as necessidades.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro para realização deste projeto. Processos nº 2012/21287-3 e 2014/00693-9.

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

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

Chico Xavier

Sumário

CAPÍTULO I 13
RESUMO 14
ABSTRACT 15
1- INTRODUÇÃO 16
2- OBJETIVO 20
3- SUJEITOS E MÉTODOS 20
3.1- Sujeitos 20
3.2- Critérios de inclusão 21
3.3- Critérios de não-inclusão 22
3.4- Dosagem de proteinúria 22
3.5- Dosagem de ácido úrico 22
3.6- Colheita de sangue 22
3.7- Isolamento e cultura de monócitos 22
3.8- Obtenção de sobrenadante de cultura de monócitos 23
3.9- Determinação das citocinas pela técnica de ELISA 23
3.10- Avaliação da expressão de transcritos relacionados à inflamação 24
3.11- Padronização de concentração de urato monossódico utilizada na cultura para estímulo de monócitos humanos 26
3.12- Determinação das citocinas IL-1β e TNF-α em sobrenadante de cultura de monócitos 26
3.13- Padronização da escolha do normalizador utilizado na técnica de RT-qPCR 28
3.14- Análise Estatística 29
4- RESULTADOS 30
4.1- Características clínicas dos grupos estudados 30
4.2- Expressão de genes relacionados ao inflamassoma em monócitos de gestantes e mulheres não grávidas 32
4.3- Produção de citocinas por monócitos de gestantes e mulheres não grávidas 35
5- DISCUSSÃO 38
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 42
Capítulo II 49
Capítulo III 77
Anexos 93

CAPÍTULO 1

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez, caracterizada por hipertensão arterial e proteinúria, identificadas após a 20ª semana de gestação. Essa patologia está associada com hiperuricemia, valores séricos elevados de citocinas inflamatórias, ativação de leucócitos e estresse oxidativo. Cristais de ácido úrico podem ativar um complexo intracelular denominado inflamassoma, uma estrutura multi-proteica importante para o processamento e liberação das citocinas inflamatórias interleucina-1 beta (IL-1β) e IL-18. Este estudo investigou, em gestantes portadoras de PE, o estado de ativação de monócitos, tanto endógeno como estimulado por urato monossódico (MSU), por meio da expressão gênica dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3, bem como a associação destes complexos com a expressão de citocinas inflamatórias por estas células. Monócitos foram obtidos do sangue periférico de 23 gestantes pré-eclâmpticas e 23 gestantes normotensas (GN) no terceiro trimestre de gestação e de 23 mulheres saudáveis, não grávidas (MNG) e cultivados na presença ou ausência de 50 µg/mL de MSU por 18 h. A presença do inflamassoma foi avaliada por meio da expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β, IL-18 e TNF-α por RT-qPCR em células não estimuladas (expressão endógena) ou após estímulo com MSU (expressão estimulada). A concentração das citocinas foi avaliada pelo método de ELISA. Os resultados foram analisados por meio de testes não-paramétricos com nível de significância de 5%. Em gestantes pré-eclâmpticas, a expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β e TNF-α em monócitos estimulados ou não com MSU, foi significativamente maior do que nos grupos GN e MNG. Além disso, observou-se maior expressão endógena de IL-18 em gestantes com PE em comparação às gestantes normotensas, enquanto a expressão estimulada da citocina foi maior no grupo PE em relação aos grupos GN e MNG. O estímulo de monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas com MSU induziu aumento na expressão gênica de NLRP3, caspase-1 e TNF-α em relação à expressão endógena nesses grupos, enquanto esse efeito não foi observado em gestantes normotensas. A pesquisa de citocinas por ELISA mostrou que monócitos de gestantes com PE produziram níveis endógenos e estimulados com MSU mais elevados de IL-1β, IL-18 e TNF-α em comparação ao grupo GN. Os resultados mostram o aumento basal da expressão dos genes relacionados aos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em monócitos de gestantes portadoras de PE, confirmando o perfil ativado dessas células. O estímulo com MSU demonstra o papel do ácido úrico na ativação do inflamassoma NLRP3, e na liberação de citocinas inflamatórias, sugerindo a participação desse complexo inflamatório na patogênese da pré-eclâmpsia.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a specific syndrome of pregnancy, characterized by hypertension and proteinuria, identified after the 20th week of pregnancy. This pathology is associated with hyperuricemia, elevated serum levels of inflammatory cytokines, leukocyte activation and oxidative stress. Uric acid crystals may activate an intracellular complex called inflammasome, a multi-protein structure which is important for processing and release of inflammatory cytokines such as interleukin-1 beta (IL-1β) and IL-18. This study investigated, in pregnant women with PE, the state of monocyte activation both endogenous and stimulated with monosodium urate (MSU), by gene expression of NLRP1 and NLRP3 inflammassomes as well as their association with inflammatory cytokines expression by these cells. Monocytes were obtained from peripheral blood of 23 preeclamptic pregnant women, 23 normotensive pregnant women (NT) in the third trimester of pregnancy and 23 healthy non-pregnant women (NP), and cultured in the presence or absence of 50 µg/mL of MSU for 18 h. Inflammasome activation was evaluated by the gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β, IL-18 and TNF-α by RT-qPCR in unstimulated monocytes (endogenous expression), or after cell stimulation with MSU (stimulated expression). The concentration of cytokines was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results were analyzed using non-parametric tests at 5% significance level. In preeclamptic pregnant women, gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β and TNF-α by monocytes, stimulated or not with MSU, was significantly higher than in NT and NP groups. In addition, there was a higher endogenous expression of IL-18 in pregnant women with PE compared with NT pregnant women, while the stimulated cytokine expression was higher in the PE group than in the other two groups studied. Stimulation of monocytes from preeclamptic and non-pregnant women with MSU induced increased expression of NLRP3, caspase-1 and TNF-α in relation to the endogenous expression in these groups, while this was not observed in the NT group. The cytokine determination by ELISA showed that monocytes from women with PE produced higher endogenous and stimulated levels of IL-1β, IL-18 and TNF-α compared to NT group. In conclusion, the results showed the increased basal expression of genes related to inflammasomes NLRP1 and NLRP3 in monocytes from women with PE. The stimulation with MSU demonstrates that uric acid play a role in NLRP3 inflammasome activation and inflammatory cytokines release, suggesting the participation of this inflammatory complex in the pathogenesis of preeclampsia.

1- INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez, sendo a principal causa de morbidade, mortalidade e parto prematuro em 2 a 7% das gestações (Cartwright et al., 2010). O diagnóstico clínico é feito a partir da vigésima semana de gravidez ou nos primeiros dias após o parto, e baseia-se no desenvolvimento de hipertensão arterial (PA ≥ 140 x 90 mmHg) e proteinúria (≥ 300 mg/24h) (NHBPEP, 2000), sendo maior a gravidade da doença quanto mais precoce acontece sua manifestação clínica (De Oliveira et al., 2010).

A PE é caracterizada por intensa reação inflamatória sistêmica, lesão endotelial, agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação e aumento da resistência vascular generalizada (Roberts, 1998; Borzychowski et al., 2006), que parecem contribuir significativamente para a fisiopatologia da doença (Redman & Sargent, 2005). Portanto, na PE observa-se ativação de células inflamatórias, como monócitos e granulócitos, bem como células endoteliais (Schuiling et al., 1997; Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006), produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Johnson et al., 2002; Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007) e quimiocinas (Visser al., 2007), bem como por alterações na produção de citocinas reguladoras, como Interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento e transformação beta (TGF-β) (Pestka et al., 2004; Visser et al., 2007; Peraçoli et al., 2008).

Também está envolvido na fisiopatologia da PE o estresse oxidativo (Kharb et al., 2000; Takagi et al., 2004), decorrente da ativação dos leucócitos que, atuando de maneira sistêmica, causa lesão do endotélio, fenômeno diretamente relacionado com a doença (Rein et al., 2003). O aumento da concentração plasmática de radicais livres precede o aparecimento das manifestações clínicas da doença e apresenta correlação significativa com os valores de pressão arterial (Erskine et al., 1985). Kharfi et al. (2005) observaram concentrações elevadas de gonadotrofina coriônica e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no soro de pacientes com PE em comparação com gestantes normotensas, mostrando ainda correlação entre esses dois parâmetros.

Na PE, a ativação excessiva de monócitos e granulócitos intravasculares, bem como de macrófagos, sugere que a ativação do sistema imune inato pode causar problemas na progressão da gestação. No entanto, o significado dessas alterações imunológicas na fisiopatologia da PE é ainda desconhecido. Peraçoli et al. (2011)

relataram a ativação endógena de monócitos de gestantes portadoras de PE, demonstrando a produção elevada de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) por essas células. Esses resultados evidenciam que a PE é caracterizada por estresse oxidativo e que os monócitos maternos circulantes podem representar importante fonte de citocinas inflamatórias durante a doença.

O estado de ativação de leucócitos do sangue periférico de gestantes com PE está associado a genes relacionados à inflamação. Esses leucócitos apresentam hiper-regulação do gene da cadeia leve de NF-κB (NF-κB-1A) em gestantes com PE (Lok et al., 2009), assim como também ocorre associação entre aumento de ativação do NF-κB e maior produção de TNF-α e IL-1β por células mononucleares de gestantes pré-eclâmpticas em comparação a gestantes normotensas (Giorgi et al., 2012). Esses resultados sugerem que, os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes do TNF-α podem estar associados às manifestações mais graves da PE (Peraçoli et al., 2007).

Em muitas pacientes com PE observa-se hiperuricemia, que se correlaciona com proteinúria elevada e gravidade da doença (Costa et al., 2012). Segundo Bainbridge & Roberts (2008), o ácido úrico tem potencial de promover inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial. Níveis elevados de ácido úrico no plasma de pacientes com PE são interpretados não apenas como um marcador de gravidade (Martin & Brown, 2010), mas representam uma contribuição direta para a patogênese da PE (Kang et al., 2004; Bainbridge & Roberts, 2008). Ácido úrico pode ser considerado um mediador da inflamação, uma vez que estimula a produção de citocinas inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF-α por células mononucleares. Correlação positiva entre o aumento da produção da citocina inflamatória TNF-α, de ânion superóxido (O_2^-) e nível sérico elevado de ácido úrico foi observada na PE (Peraçoli et al., 2011).

A hiperuricemia na PE também pode estar relacionada com a elevada produção de IL-1β e TNF-α encontrada nessas pacientes. Correlação positiva entre produção elevada de TNF-α e de ânion superóxido por monócitos e altos níveis séricos de ácido úrico foi descrita na PE (Peraçoli et al., 2011). Além disso, observou-se associação entre níveis plasmáticos elevados de acido úrico, proteína de choque térmico Hsp70, IL-1β, IL-12 e TNF-α nos casos mais graves dessa

patologia obstétrica (Peraçoli et al., 2013). Cristais de ácido úrico podem ativar um complexo intracelular denominado inflamassoma, uma estrutura multi-proteica, importante para o processamento e liberação de IL-1β e IL-18 (Martinon et al., 2006). Assim, a hiperuricemia em gestantes com PE pode representar importante contribuição para a fisiopatologia da PE por seu potencial em promover a inflamação (Bainbridge & Roberts, 2008), devido sua associação com citocinas pró-inflamatórias.

Células do sistema imune inato, como monócitos, macrófagos e células dendríticas, expressam receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) considerados componentes centrais do sistema imune inato e envolvidos na resposta inflamatória de monócitos (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Entre os vários PRRs, a principal família é denominada de receptores semelhantes ao *Toll* (TLRs), que reconhecem e ligam moléculas presentes na superfície de patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Koga & Mor, 2008). Os receptores TLR reconhecem não apenas componentes de microrganismos, contribuindo para a defesa do hospedeiro contra infecções, mas também ligam produtos endógenos de células do hospedeiro, que são liberados durante lesão tecidual e denominados “sinais de perigo” ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Matzinger, 2002; Kim et al., 2005). Estes produtos são representados por moléculas como reativos intermediários do oxigênio, proteínas liberadas de células mortas (Park et al., 2004) e produtos liberados da matriz extracelular, como fibronectina (Okamura et al., 2001). A ativação de TLRs pode regular a fagocitose e atividade microbicida, como também a liberação de citocinas e diferenciação de células dendríticas imaturas em maduras, capacitando o sistema imune inato a induzir a resposta imune adaptativa (Krutzik et al., 2005).

Outros receptores PRRs compreendem os membros da família de receptores Nod-like ou NLR (proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica), que são proteínas citosólicas que reconhecem PAMPs e DAMPs citoplasmáticos e recrutam outras proteínas, formando complexos de sinalização que promovem a inflamação. Esses complexos de sinalização são chamados inflamassomas e geram formas ativas de IL-1β (Abbas et al., 2011). Ao contrário dos receptores TLR, que reconhecem PAMPs na superfície celular ou dentro dos endossomas, os receptores NLRs reconhecem moléculas microbianas ou endógenas dentro do citoplasma da

célula hospedeira (Franchi et al., 2009). A ligação de lipopolissacáride (LPS), ácido lipoteicóico, flagelina, cristais de ácido úrico (MSU), entre outros PAMPs e DAMPs ativam receptores NLR, incluindo NLRP1, NLRP3, NLRC4, que são responsáveis pela formação do inflamassoma (Lamkanfi et al., 2007). Após interação com PAMPs ou DAMPs, NLRP1 ou NLRP3 recrutam uma proteína adaptadora chamada ASC. Esta se liga à forma precursora inativa da enzima caspase-1 que se torna ativa e cliva a pró-IL-1β, resultando na geração de IL-1β biologicamente ativa que, subsequentemente, é secretada no meio extracelular (Pétrilli et al., 2007; Eder, 2009; Franchi et al., 2009; Abbas et al., 2011). NLRP1 e NLRP3 são expressos em células imunes, mas também em outros tipos celulares como células placentárias (Abrahams, 2011; Pontillo et al., 2013).

A ativação do inflamassoma NLRP3 é importante para a defesa do hospedeiro e eliminação de patógenos como fungos, bactérias e vírus, sendo os produtos de sua ativação, IL-1β e IL-18, moléculas protetoras em várias infecções (Dinarello & Fantuzzi, 2003; Dinarello, 2009). Também é ativado em condições de estresse celular ou injúria (Yang et al., 2012). Além disso, algumas evidências indicam que o NLRP3 tem importante papel em doenças inflamatórias como aterosclerose, gota e diabetes tipo I (Duewell et al., 2010; Grishman et al., 2011; Kingsbury et al., 2012). Entretanto, os diferentes ligantes e o mecanismo exato da ativação do inflamassoma NLRP3 ainda não estão bem esclarecidos (Strowing et al., 2012). Várias moléculas endógenas, consideradas sinais de perigo, tais como cristais de ácido úrico, cristais de colesterol, radicais livres derivados do oxigênio e ácidos graxos, quando em altas concentrações, induzem ativação do inflamassoma NLRP3, desempenhando papel importante em doenças inflamatórias (Schroder & Tschopp, 2010). Segundo Yang et al. (2012), uma melhor compreensão da natureza específica desse inflamassoma seria importante para revelar a fisiopatologia molecular de várias doenças inflamatórias e para identificar terapêuticas potenciais para controle dessas doenças.

Conforti-Andreoni et al. (2011) reportaram a importância do ácido úrico, juntamente com a via de sinalização do NF-κB, na ativação do inflamassoma em células dendríticas e produção de citocinas IL-1β e IL-18. Segundo Rock et al. (2012), o ácido úrico desempenha papel fisiopatológico como sinal de alarme local, que alerta o sistema imune contra injúria celular e auxilia no desenvolvimento das

respostas imunes inata e adaptativa. O componente inflamatório dessas respostas é detectado quando cristais de urato ativam vias dependentes ou independentes do inflamassoma para gerar a produção de IL-1β, responsável pela resposta inflamatória intensa. O receptor NLRP3 é descrito como sensor de ácido úrico que induz a produção de IL-1β em linhagens de células trofoblásticas. Assim, a hiperuricemia associada à PE poderia estar relacionada à ativação do inflamassoma NLRP3 no trofoblasto, aumentando consequentemente os níveis de IL-1β na placenta (Mulla et al., 2011). Recentemente, um estudo de polimorfismo dos genes associados ao inflamassoma em gestantes portadoras de PE demonstrou associação de NLRP1, variante rs12150220 (L155H), com o desenvolvimento de PE, sugerindo o papel desse receptor na patogênese dessa doença (Pontillo et al., 2014).

Considerando que concentrações elevadas de ácido úrico são frequentemente observadas nas gestações complicadas por PE, estando associadas com estresse oxidativo e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias produzidas por monócitos, o presente projeto visa avaliar a presença de ativação dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 nessas células em gestantes portadoras de PE. O conhecimento das vias do inflamassoma nos monócitos poderá trazer melhor compreensão do envolvimento da imunidade inata na fisiopatologia da PE.

2- OBJETIVO

- ✓ Avaliar o estado de ativação, endógena e induzida por urato monossódico, de monócitos em gestantes portadoras de PE pela presença dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e sua associação com a produção de IL-1β, IL-18 e TNF-α por essas células.

3- SUJEITOS E MÉTODOS

3.1- Sujeitos

Foram estudadas 46 gestantes, sendo 23 portadoras de PE (grupo estudo) e 23 primigestas normotensas, pareadas pela idade gestacional, que realizaram a assistência ao parto na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de

Medicina de Botucatu – UNESP. Também foram incluídas no estudo 23 mulheres saudáveis, não grávidas, doadoras voluntárias do Banco de Sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

A idade gestacional dos grupos estudados foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou por exame ultra-sonográfico precoce (< 20 semanas de gestação).

Uma gestante foi considerada portadora de PE quando, sem antecedente de hipertensão arterial, manifestou hipertensão arterial (≥ 140x90 mmHg) associada à proteinúria (≥ 300 mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20ª semana de gestação (NHBPEP, 2000).

O tamanho amostral foi calculado, considerando-se a diferença de médias entre IL-1β para os grupos de gestantes normotensas e gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, com base nos resultados apresentados em trabalho anterior (Giorgi et al., 2012). Considerando uma confiabilidade de 95%, poder de 90% e 20% de variabilidade nos valores de IL-1β o tamanho amostral foi de, no mínimo 23 indivíduos para cada grupo. Foi adicionado um grupo de 23 mulheres não grávidas para estabelecer a comparação dos parâmetros imunológicos entre os grupos.

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo nº 349.847).

3.2- Critérios de inclusão

Gestantes normotensas: mulheres com gestação única, com idade gestacional entre 28 e 40 semanas, não ter o diagnóstico de pré-eclâmpsia ou qualquer outra doença clínica ou obstétrica.

Gestantes com pré-eclâmpsia: mulheres com gestação única, com idade gestacional entre 28 e 40 semanas e diagnóstico de pré-eclâmpsia.

Mulheres normais, não grávidas: ter a mesma faixa etária das gestantes e serem doadoras voluntárias do Banco de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, sem diagnóstico de qualquer patologia obstétrica ou clínica.

3.3- Critérios de não-inclusão

Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de pré-eclâmpsia, tais como: gestação gemelar, pré-eclâmpsia anterior, hipertensão crônica, diabetes, doenças renais, doenças infecciosas, má-formação fetal, soro positividade para HIV e uso de drogas e álcool durante a gestação.

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- Dosagem de ácido úrico

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

3.6- Colheita de sangue

A colheita de sangue, para a avaliação da expressão de receptores e produção de citocinas por monócitos de gestantes portadoras de PE foi feita no momento do diagnóstico da doença e, a de gestantes normais, no momento em que foram pareadas pela idade gestacional com gestantes pré-eclâmpticas. O sangue das mulheres não grávidas foi obtido durante a doação de sangue.

3.7- Isolamento e cultura de monócitos

O sangue periférico obtido das gestantes e das mulheres saudáveis não grávidas foi colocado em tubo estéril contendo EDTA (Greiner Bio-one, Americana - Brasil). As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), segundo a técnica descrita por Boyum (1968). O anel rico em células mononucleares foi lavado, duas vezes, com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) por 10 min a 200 *g*. Após esses procedimentos, as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma), 40 µg/mL de gentamicina e 10%

de soro bovino fetal (Gibco BRL Life Technologies, Breda, The Netherlands) inativado (meio RPMI completo), sendo a identificação dos monócitos estimadas por incorporação de vermelho neutro. Para isso, 50 µL da suspensão de células mononucleares foram incubadas por 10 min a 37ºC com 450 µL da solução de vermelho neutro a 0,02%. Os monócitos foram diferenciados por apresentarem citoplasma de coloração vermelha e a concentração celular foi ajustada para $5x10^5$ monócitos viáveis/mL, após contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer. Essas células foram distribuídas em placas de cultura de 24 orifícios (Linbro, FlowLab, USA) e incubadas por 60 min a 37^{o}C, em tensão de 5% de CO_2. As células não aderentes foram eliminadas pela lavagem dos orifícios da placa com meio de cultura RPMI.

3.8- Obtenção de sobrenadante de cultura de monócitos

Para avaliar a produção das citocinas IL-1β, IL-18 e TNF-α, os monócitos, obtidos conforme descrito no item 3.7 foram incubados a 37°C, em tensão de 5% de CO_2 por 18 h, na ausência ou presença de 10, 50 e 100 µg/mL de urato monossódico (InvivoGen, San Diego, CA, USA) para padronização. A concentração de 50 µg/mL foi utilizada, por sua vez, para a realização dos experimentos. O sobrenadante obtido após 18 h de cultivo foi aspirado, centrifugado a 600 *g* e distribuído em alíquotas, que foram conservadas a -80^{o}C até o momento da dosagem das citocinas IL-1β, IL-18 e TNF-α por ensaio imunoenzimático (ELISA).

3.9- Determinação das citocinas pela técnica de ELISA

Para quantificação das citocinas IL-1β e TNF-α nos sobrenadantes de cultura de monócitos, tratados ou não com urato monossódico, foram empregados kits comerciais específicos obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). O limite de sensibilidade desses kits foram de 1,6 pg/mL para TNF-α e 1,0 pg/mL para IL-1β. Para a quantificação da citocina IL-18, foi utilizado o kit comercial específico obtido da MBL (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japão). O limite de sensibilidade desse kit foi de 12,5 pg/mL. As reações foram desenvolvidas segundo as instruções do fabricante.

3.10- Avaliação da expressão de transcritos relacionados à inflamação

Os monócitos foram incubados na presença ou ausência de 50 µg/mL de MSU por 4 h e posteriormente submetidos à análise da expressão, em nível transcricional, dos genes que codificam as proteínas caspase-1, IL-1β, IL-18, NLRP1, NLRP3 e TNF-α. O RNA total dos monócitos foi extraído por meio do sistema Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.,Thorold, ONL2V4Y6, Canadá), conforme protocolo do fabricante. Após a extração, a fim de garantir a completa remoção de DNA genômico, 1 µg 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 fluorometria utilizando o equipamento Qubit® Fluorometric Quantitation, Life Technologies. Posteriormente, a síntese de DNA complementar (cDNA) para execução da Reação em Cadeia da Polimerase acoplada a transcrição reversa (*Reverse Transcription-coupled Polymerase Chain Reaction* – RT-PCR) foi realizada com 450 ng de RNA total por 60 µL de reação, utilizando ImProm-II™ Reverse Transcription System, conforme protocolo do fabricante.

A quantificação da expressão gênica de caspase-1, IL-1β, IL-18, NLRP1, NLRP3, TNF-α e GAPDH 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 5.1 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 20 µL cada, o qual contém 0,3 µM de cada iniciador (*forward e reverse*), 2 µL de cDNA, 10 µL de mastermix e 6,8 µL de água livre de nuclease. Adicionalmente, foi inserido um controle, também em duplicata, o qual foi incluído em cada reação a fim de provar a ausência de contaminação. As condições para a reação de RT-qPCR foram: desnaturação inicial a 96°C-2 min e 40 ciclos a 95°C – 15 s e 60°C – 60 s, 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 caspase-1, IL-1β, IL-18, NLRP1, NLRP3 e TNF-α em estudo por RT-qPCR.

Alvo	Sequência (5'-3')	Comprimento do produto	Acesso ao GenBank
Caspase-1	Forward primer: (1065)AGACATCCCACAATGGGCTC(1084) Reverse primer: (1172)TGAAAATCGAACCTTGCGGAAA(1151)	108pb	NM_033292.3
IL-1β	Forward primer: (544)GAGCAACAAGTGGTGTTCTCC(564) Reverse primer: (653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)	110pb	NM_000576.2
IL-18	Forward primer: (438)ACTGTAGAGATAATGCACCCCG(459) Reverse primer: (517)AGTTACAGCCATACCTCTAGGC(496)	80pb	NM_001562.3
NLRP1	Forward primer: (1728)TCCGGCTCCCATTAGACAGA(1747) Reverse primer: (1810)AGACCCATCCTGGCTCATCT(1791)	83pb	NM_033004.3
NLRP3	Forward primer: (2826)GAGGAAAAGGAAGGCCGACA(2845) Reverse primer: (2917)TGGCTGTTCACCAATCCATGA(2897)	92pb	NM_004895.4
TNF-α	Forward primer: (325)GCTGCACTTTGGAGTGATCG(344) Reverse primer: (462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)	138pb	NM_000594.3
	Controles internos da reação		
GAPDH	Forward primer: (684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703) Reverse primer: (801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	118pb	NM_002046.4
β-actina	Forward primer: (1061)AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT(1083) Reverse primer: (1180)CGGACTCGTCATACTCCTGC(1161)	120pb	NM_001101.3

Os valores de expressão dos transcritos analisados foram normalizados com base na análise concomitante da expressão do gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (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) com 4 pontos em duplicatas, realizada a partir de uma amostra de RNA na concentração de $2x10^6$ monócitos/mL. Todas as condições, inclusive o GAPDH de cada amostra e o controle negativo da reação (*No Template Control* – NTC; ausência de RNA) foram analisadas em

duplicatas. Para análise da expressão relativa, após a análise da expressão gênica, escolheu-se uma amostra de RNA obtida de cada grupo estudado, as quais receberam o valor relativo de 100. Todas as outras amostras receberam valores relativos a essa amostra.

3.11- Padronização de concentração de urato monossódico utilizada na cultura para estímulo de monócitos humanos

Para a realização da dosagem de citocinas e avaliação da expressão de RNA mensageiro (RNAm) em monócitos, foi inicialmente realizada a padronização da concentração ideal de urato monossódico (MSU). Para isso, os monócitos de mulheres saudáveis, não grávidas foram estimulados com diferentes concentrações de MSU (10, 50 e 100 µg/mL) durante 18 h e os níveis de IL-1β (Figura 1) e TNF-α (Figura 2) foram avaliados. Foi utilizado, como controle positivo, o estímulo de 10 ng/mL de lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS).

3.12- Determinação das citocinas IL-1β e TNF-α em sobrenadante de cultura de monócitos

O resultado da produção de IL-1β (Figura 1) por monócitos de mulheres saudáveis submetidos ao estímulo com MSU mostrou que o urato monossódico nas doses de 10 e 50 µg/mL induziu a produção de níveis mais elevados de IL-1β em relação às culturas controle (CO), não estimuladas. Diferença significativa também foi observada na comparação entre LPS (controle positivo) e a cultura controle (CO).

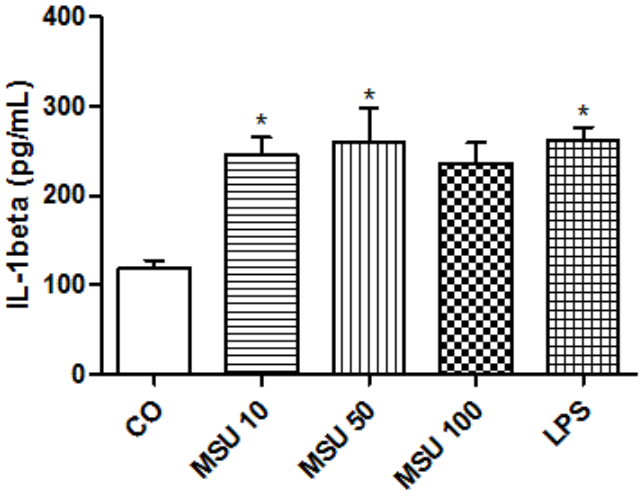


Figura 1. Padronização das concentrações de urato monossódico (MSU) determinadas pela avaliação da produção de IL-1β por monócitos. Os resultados são expressos em média e desvio padrão dos valores obtidos de 05 mulheres saudáveis não grávidas. CO – culturas controle, sem estímulo. *(p<0,05) vs CO (ANOVA).

A produção de TNF-α (Figura 2) por monócitos de mulheres saudáveis não grávidas, submetidos ao estímulo com MSU, mostrou que a concentração de 50 µg/mL induziu a produção de níveis significativamente mais elevados de TNF-α em relação à cultura controle, não estimulada. Resultados semelhantes foram observados quando as células foram estimuladas com LPS (controle positivo).

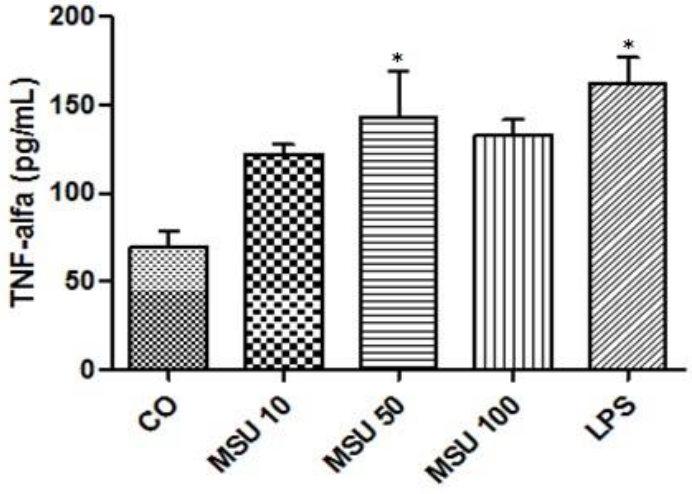


Figura 2: Padronização das concentrações de urato monossódico (MSU) determinadas pela avaliação da produção de TNF-α por monócitos. Os resultados são expressos em média e desvio padrão dos valores obtidos de 05 mulheres saudáveis não grávidas. CO – culturas controle, sem estímulo. *(p<0,05) vs CO (ANOVA).

A concentração de MSU escolhida para estímulo dos monócitos, dosagem de citocinas e avaliação da expressão de RNAm nessas células foi a de 50 µg/mL de MSU, já que demonstrou diferença significativa quando comparadas com o controle, em ambas as citocinas testadas.

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

O RNAm extraído de monócitos de mulheres saudáveis não grávidas (n=10), tratados ou não com urato monossódico, foi utilizado para padronização da técnica de RT-qPCR. As figuras 3A e 3B representam as curvas de amplificação do gene da β-actina e do GAPDH, respectivamente. Pode-se observar que as curvas de amplificação da β-actina (Figura 3A) apresentaram uma maior diferença entre os Cts (*Cycle threshold*) do que a diferença observada para as curvas do GAPDH (Figura 3B). Portanto, para normalização das reações de RT-qPCR, foi utilizado o GAPDH, o qual demonstrou mais uniformidade de amplificação.

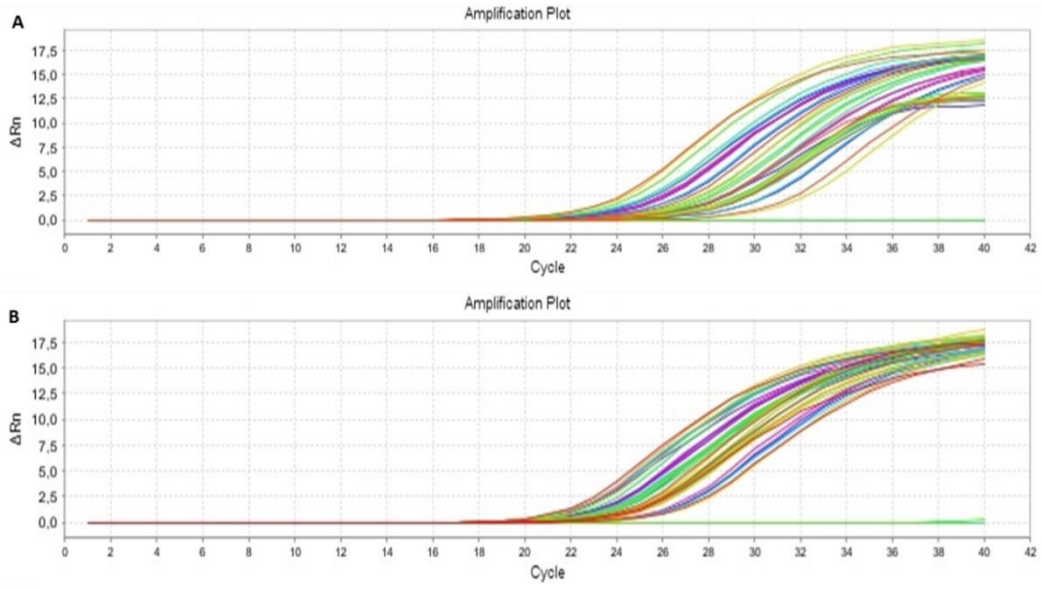


Figura 3: Representação gráfica das curvas de amplificação da expressão gênica de β-actina (A) e GAPDH (B) de monócitos de mulheres não grávidas (n=10) pela técnica de RT-qPCR.

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 Sybr Green. As reações apresentaram pico único de curva de dissociação para cada amostra, comprovando a especificidade da reação (Figura 4). Novamente, o emprego do GAPDH (Figura 4B) confirma a escolha desse normalizador para a técnica de RT-qPCR.

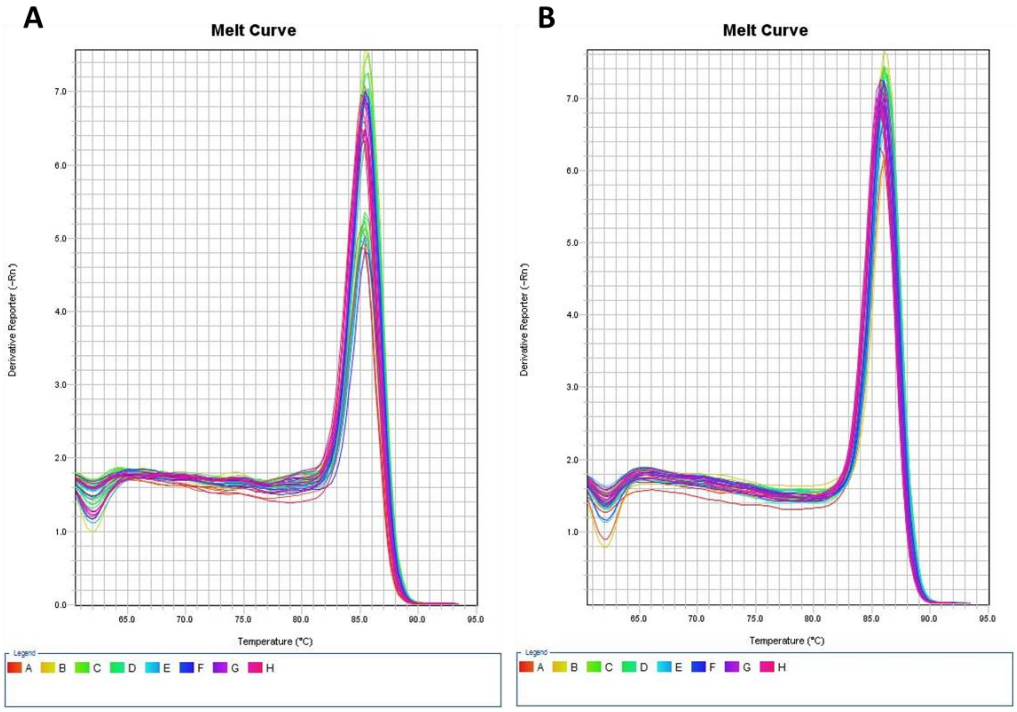


Figura 4: Representação gráfica da curva de dissociação da β-actina (A) e GAPDH (B) por monócitos de mulheres não grávidas (n=10) por RT-qPCR.(r^2=0.980 e Eficiência=99%).

3.14- Análise Estatística

Os resultados foram avaliados pelos métodos não-paramétricos, teste de Kruskal-Wallis e teste *U* de Mann-Withney, utilizando o programa estatístico INSTAT, GraphPad, San Diego, CA, USA (2000). O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5% ($p < 0,05$).

4- RESULTADOS

4.1- Características clínicas dos grupos estudados

A análise das características clínicas das gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não grávidas (Tabela 1) mostrou não haver diferença estatística entre a idade dos grupos avaliados. Da mesma forma, não houve diferença significativa entre as gestantes com PE e normotensas, com relação aos parâmetros de raça, idade gestacional e paridade. Os valores da pressão arterial sistólica e diastólica, bem como a concentração sérica de ácido úrico, foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nas gestantes portadoras de PE em relação às gestantes normotensas e mulheres não grávidas. Adicionalmente, os níveis de proteinúria foram significativamente mais elevados ($p < 0,05$) no grupo de gestantes com PE em comparação com o grupo de gestantes normotensas.

Tabela 1. Características clínicas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, gestantes normotensas e mulheres não grávidas.

Características	Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (n = 23)	Gestantes Normotensas (n = 23)	Mulheres não grávidas (n = 23)
Idade (anos)	25 (14 – 41)	25 (13 – 43)	24 (21 – 42)
Raça			
Branca (%)	84,6	91,3	87,0
Não-branca (%)	15,4	8,7	13,0
Idade gestacional (semanas)	35 (24 – 40)	34 (23 – 39)	–
Paridade			
Nulípara (%)	63	68	–
Multípara (%)	37	32	
Pressão arterial Sistólica (mmHg)	160 # (140 – 200)	110 (90 – 112)	114 (100 – 120)
Pressão arterial Diastólica (mmHg)	110 # (90 – 120)	69 (63 – 70)	70 (65 – 80)
Proteinúria (mg/urina 24h)	1540 * (300 – 19 880)	< 300	ND
Ácido úrico (mg/dL)	5,9 # (4,5 – 10,1)	3,8 (2,2 – 4,6)	4,1 (2,8 – 4,8)

Os valores estão expressos em percentagem ou em mediana, com os valores mínimo e máximo entre parênteses. ND = não determinado. * ($p < 0,05$) vs gestantes normotensas (teste *U* de Mann-Whitney).
($p< 0,05$) vs gestantes normotensas e mulheres não grávidas (teste de Kruskal-Wallis).

4.2- Expressão de genes relacionados ao inflamassoma em monócitos de gestantes e mulheres não grávidas

Realizou-se a quantificação relativa da expressão dos genes para TNF-α, IL-1β, IL-18, NLRP1, NLRP3 e caspase-1 em monócitos de 23 gestantes portadoras de PE, 23 gestantes normotensas (GN) e 23 mulheres saudáveis não grávidas (MNG), estimulados ou não com urato monossódico (MSU).

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.

Nas figuras 5A, 5B e 5C pode-se observar maior expressão gênica dos receptores NLRP1 e NLRP3 e de caspase-1 em monócitos de gestantes portadoras de PE, estimulados ou não com MSU, quando comparado aos grupos GN e MNG. Menor expressão desses genes foi detectada em monócitos de GN, estimulados ou não com MSU, em comparação com o grupo MNG. Nos grupos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas, o estímulo com MSU induziu maior expressão de NLRP3 e caspase-1 em relação aos níveis endógenos de RNAm nos monócitos desses grupos. Houve tendência a aumento de RNAm para NLRP1 nas células das gestantes com PE estimuladas com MSU em comparação às células não-estimuladas; porém essa diferença não foi significativa.

Os resultados mostram que houve maior nível transcricional do receptor NLRP3 em relação ao NLRP1 em monócitos de gestantes com PE e em mulheres não grávidas.

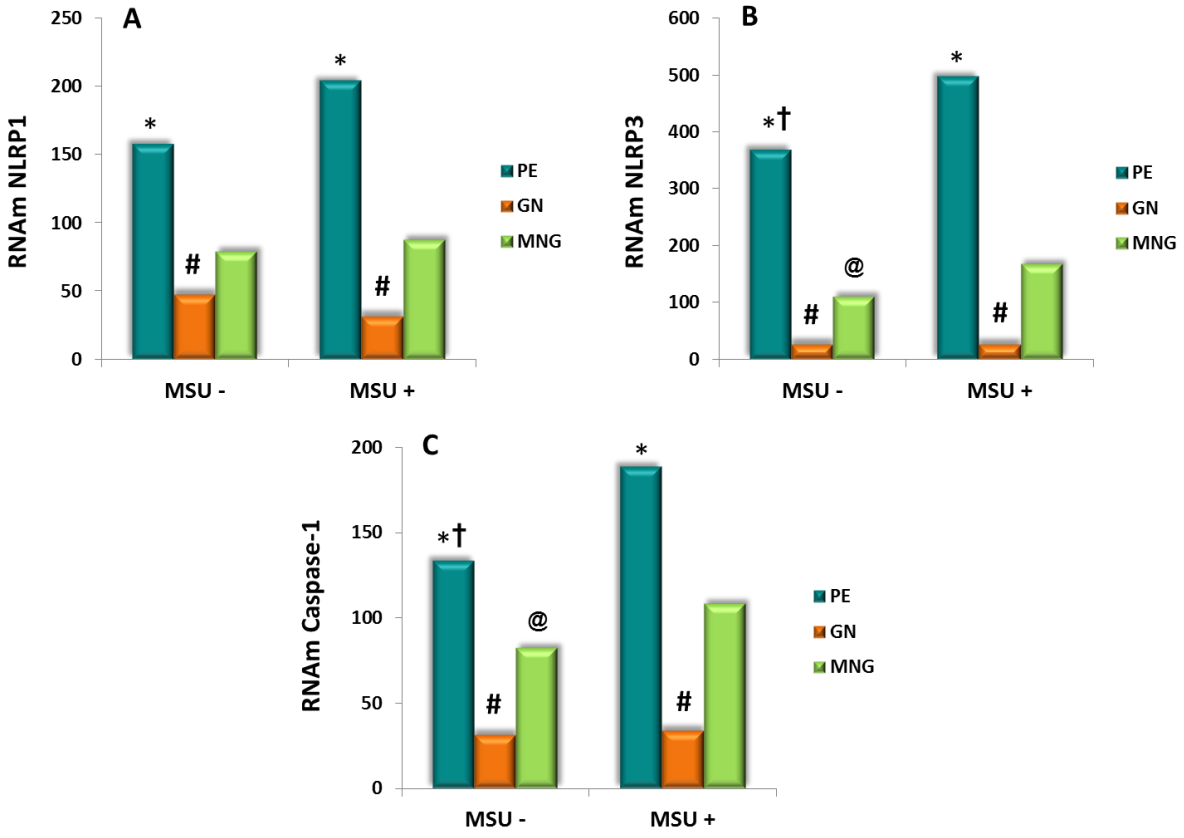


Figura 5. Expressão gênica de NLRP1 (A), NLRP3 (B) e caspase-1 (C) em monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia (PE), de gestantes normotensas (GN) e de mulheres não grávidas (MNG), estimulados (MSU+) ou não (MSU-) com urato monossódico (MSU). * p<0,05 vs. GN e MNG; # p<0,05 vs. MNG; † p<0,05 vs. PE MSU+. @ p<0,05 vs. MNG MSU+.

A figura 6A representa elevada expressão gênica da citocina IL-1β em monócitos de gestantes portadoras de PE, estimulados ou não com MSU, quando comparada com os grupos GN e MNG. Também é possível notar menor expressão do gene IL-1β em monócitos de GN, estimulados ou não com MSU, do que no grupo MNG. Não houve diferença entre os valores endógenos e estimulados com MSU de RNAm para IL-1β em monócitos dos três grupos estudados.

A expressão endógena do gene da IL-18 em monócitos de gestantes pré-eclâmpticas foi significativamente maior do que no grupo GN (Figura 6B). Além disso, monócitos de gestantes com PE, estimulados com MSU tiveram maior expressão do gene IL-18 em comparação com os grupos GN e MNG, também estimulados com MSU. Células do grupo GN estimuladas com MSU, por sua vez, apresentaram menor expressão gênica dessa citocina em relação ao grupo MNG.

Adicionalmente, a expressão gênica de IL-18 em monócitos de gestantes com PE que foram estimulados com MSU (MSU+) foi maior quando comparado com o mesmo grupo, porém sem o estímulo (MSU-).

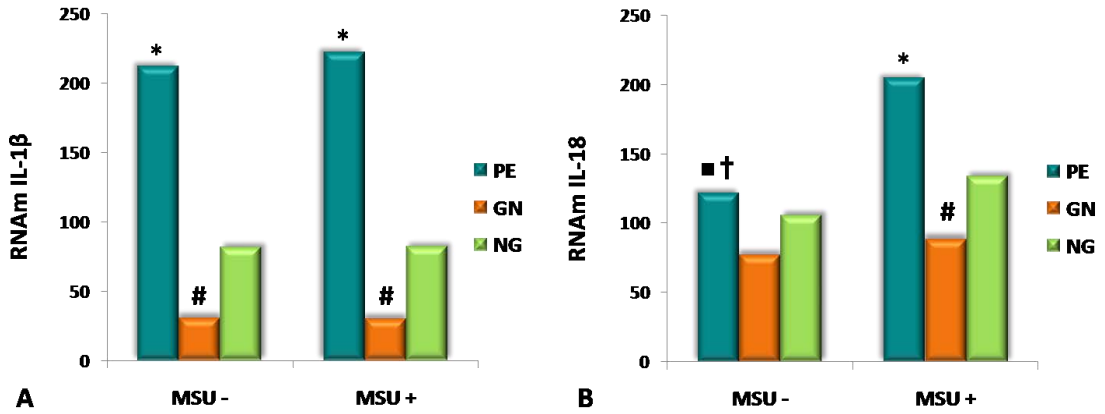


Figura 6. Expressão gênica de IL-1β (A) e IL-18 (B) em monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia (PE), de gestantes normotensas (GN) e de mulheres não grávidas (MNG), estimulados (MSU+) ou não (MSU-) com urato monossódico (MSU). * p<0,05 vs. GN e MNG; # p<0,05 vs. MNG; ■ p<0,05 vs. GN; † p<0,05 vs. PE MSU+.

Na figura 7 observa-se aumento significativo na expressão gênica de TNF-α em monócitos de gestantes com PE, estimulados ou não com MSU, em relação aos grupos GN e MNG. No grupo de gestantes normotensas o estímulo com MSU não alterou a menor expressão de TNF-α pelos monócitos comparados ao grupo MNG. Além disso, observa-se diferença significativa entre a expressão gênica de TNF-α, endógena e a estimulada com MSU em monócitos de gestantes com PE e de mulheres não grávidas.

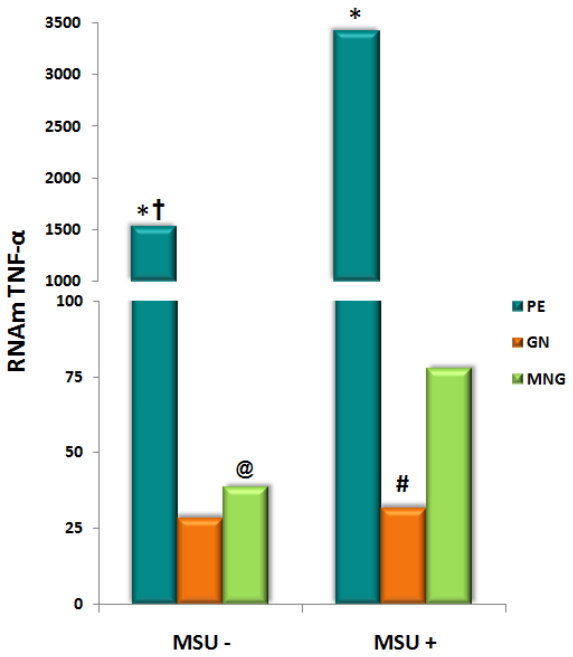


Figura 7. Expressão gênica de TNF-α em monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia (PE), de gestantes normotensas (GN) e de mulheres não grávidas (MNG), estimulados (MSU+) ou não (MSU-) com urato monossódico (MSU). * p<0,05 vs. GN e MNG; # p<0,05 vs. MNG; † p<0,05 vs. PE MSU+; @ p<0,05 vs. MNG MSU+.

4.3- Produção de citocinas por monócitos de gestantes e mulheres não grávidas

A produção das citocinas IL-1β, IL-18 e TNF-α por monócitos de 23 gestantes portadoras de PE, 23 gestantes normotensas e 23 mulheres saudáveis não grávidas, estimulados ou não com urato monossódico (MSU) está representada nas Figuras 8A, 8B e 9, respectivamente.

Na figura 8A observa-se concentração endógena de IL-1β, produzida por monócitos de gestantes portadoras de PE significativamente mais elevada em relação aos grupos GN e MNG. O estímulo com MSU induziu maior produção de IL-1β pelas células de gestantes pré-eclâmpticas apenas quando comparada ao grupo GN. Também é possível notar diminuição dos níveis da citocina em monócitos de GN estimulados ou não com MSU na comparação com o grupo MNG. Além disso, observa-se diferença significativa entre a produção de IL-1β por monócitos dos grupos GN e MNG que foram estimulados com MSU (MSU+) e a produção basal dessas células. Houve tendência a aumento da citocina em monócitos de gestantes com PE estimulados com MSU comparados às células não estimuladas, porém essa diferença não foi significativa.

Observou-se aumento na concentração proteica de IL-18 em monócitos de gestantes com PE, estimulados ou não com MSU, em relação ao grupo GN (Figura 8 B). Nota-se também diminuição na expressão da citocina em monócitos de GN, estimulados ou não com MSU, quando comparada com o grupo MNG. Além disso, houve diferença significativa entre a produção de IL-18 por monócitos de gestantes com PE e de mulheres não grávidas estimulados com MSU (MSU+) e a expressão em células que não foram estimuladas (MSU-).

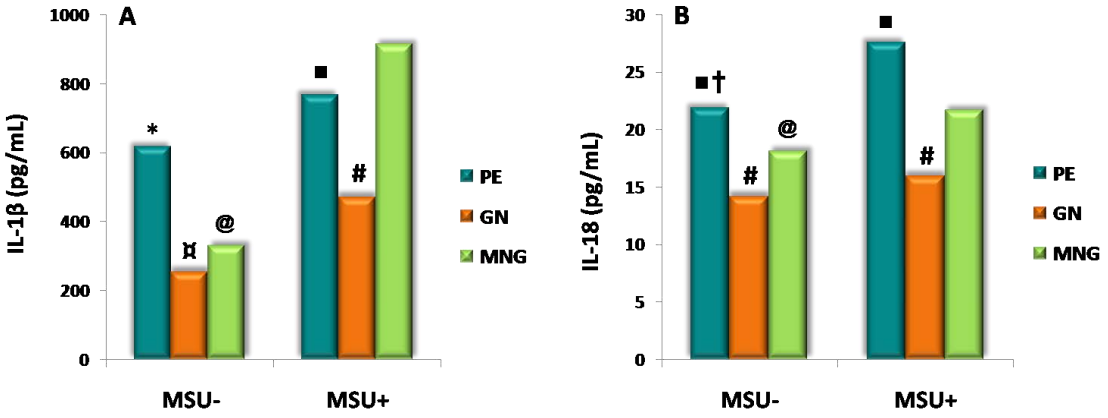


Figura 8. Produção de IL-1β (A) e IL-18 (B) por monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia (PE), de gestantes normotensas (GN) e de mulheres não grávidas (MNG), estimulados (MSU+) ou não (MSU-) com urato monossódico (MSU). * p<0,05 vs. GN e MNG; # p<0,05 vs. MNG; ■ p<0,05 vs. GN; † p<0,05 vs. PE MSU+; ¤ p<0,05 vs. GN MSU+; @ p<0,05 vs. MNG MSU+.

Na figura 9 observa-se maior concentração proteica endógena de TNF-α em monócitos de gestantes portadoras de PE em relação aos demais grupos. O estímulo com MSU levou à maior produção de TNF-α pelas células das gestantes pré-eclâmpticas apenas quando comparada com o grupo GN. Também é possível notar menor expressão da proteína TNF-α em monócitos de gestantes normotensas, estimulados ou não com MSU, quando comparado com o grupo MNG. Além disso, monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas estimulados com MSU apresentaram maior produção de TNF-α em relação à produção basal por essas células.

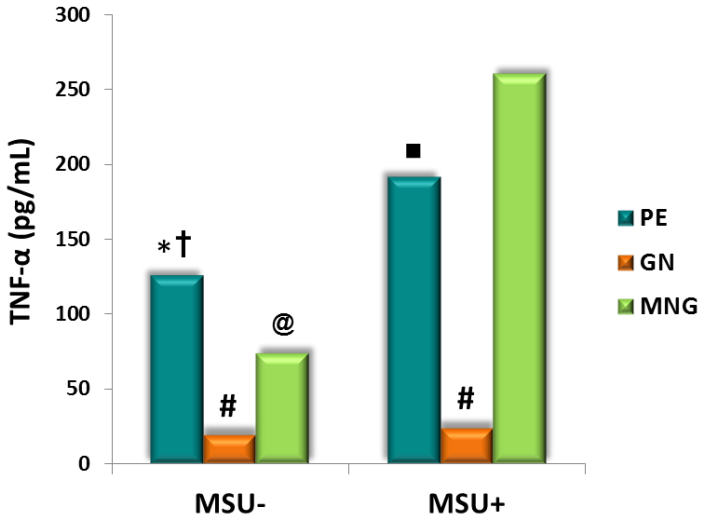


Figura 9. Produção TNF-α por monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia (PE), de gestantes normotensas (GN) e de mulheres não grávidas (MNG), estimulados (MSU+) ou não (MSU-) com urato monossódico (MSU). * p<0,05 vs. GN e MNG; # p<0,05 vs. MNG; ■ p<0,05 vs. GN; † p<0,05 vs. PE MSU+; @ p<0,05 vs. MNG MSU+.

Em conjunto, os resultados do presente estudo mostram haver perfil de expressão endógena dos receptores NLRP1 e NLRP3 e de caspase-1 semelhante em monócitos de gestantes portadoras de PE e de mulheres não grávidas, embora os valores da expressão relativa de NLRP3 tenham sido mais elevados do que os de NLRP1. A expressão de RNAm das citocinas IL-1β e IL-18, assim como a produção dessas citocinas pelos monócitos nos grupos estudados, mostrou associação com o perfil de NLRP1 e NLRP3, evidenciando a ativação endógena desses complexos inflamassomas.

O estímulo com MSU, induzindo maior expressão do receptor NLRP3 e caspase-1, bem como a produção de IL-18, foi mais evidente nos grupos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas, mostrando que o ácido úrico é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3.

Os resultados da expressão de RNAm de TNF-α e da produção dessa citocina confirma o estado inflamatório dos monócitos na PE em relação aos demais grupos estudados. Além disso, o estímulo com MSU aumenta a transcrição e a tradução do TNF-α por monócitos de gestantes portadoras de PE e mulheres não grávidas, demonstrando que o ácido úrico também induz a produção dessa citocina.

5- DISCUSSÃO

Gestantes com PE apresentam níveis séricos elevados de ácido úrico, associados à maior produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β e TNF-α por células mononucleares do sangue periférico (Giorgi et al., 2012), evidenciando a participação da hiperuricemia na patogênese da PE. Sabe-se que cristais de ácido úrico (MSU) atuam como DAMPs e são capazes de ativar o complexo inflamassoma NLRP3 (Lamkanfi et al., 2007). Os resultados do presente trabalho mostram maior expressão gênica dos receptores NLRP1 e NLRP3, de caspase-1, bem como de IL-1β, IL-18 e TNF-α em monócitos do sangue periférico de gestantes portadoras de PE. Esses resultados sugerem ativação endógena dessas células, associada com aumento da produção das citocinas inflamatórias quando comparados com monócitos de gestantes normotensas.

É possível notar que a expressão gênica de NLRP1, NLRP3 e caspase-1 possui perfis semelhantes entre si e apresentam maior expressão em monócitos de gestantes pré-eclâmpticas em comparação com os grupos das gestantes normotensas e mulheres não grávidas. Em trabalho recente, Mulla et al. (2011) mostraram que o ácido úrico ativa o inflamassoma em células trofoblásticas, resultando no processamento e secreção de IL-1β, sugerindo ser este, um novo mecanismo para a indução da inflamação na interface materno-fetal e ocasionando resultados adversos na gestação, incluindo a pré-eclâmpsia.

Segundo Martinon et al. (2006), o urato monossódico desencadeia aumento da expressão gênica de NLRP3 e caspase-1 em linhagem de monócitos THP1. Nossos resultados corroboram os desses autores, mostrando que o estímulo com MSU induz aumento da expressão de NLRP3 e caspase-1 em monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas, enquanto o gene NLRP1 apresentou apenas uma tendência ao aumento de expressão em monócitos de gestantes com PE. Caspases são proteases de cisteinil aspartato importantes nos mecanismo de apoptose e inflamação (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004). A caspase-1 é uma importante proteína inflamatória sintetizada na forma de pró-caspase-1 e se torna biologicamente ativa quando o inflamassoma inicia seu processo de formação (Strowiget al., 2012; Davis et al, 2011). É reconhecido pela literatura que os inflamassomas NLRP1, NLRP3, IPAF e AIM2 são responsáveis pelo processo de

ativação da caspase-1, levando ao processamento e liberação de IL-1β e IL-18 (Schroder & Tschopp, 2010).

A expressão gênica dos receptores NLRP1 e NLRP3, de caspase-1, IL-1β, IL-18 e TNF-α, bem como a produção das citocinas citadas, foi maior em monócitos de gestantes com PE estimulados com MSU em relação às gestantes normotensas. Contudo, quando comparados com monócitos de mulheres saudáveis, esse aumento é significativo apenas em nível transcricional e não proteico. Essa diferença entre a expressão gênica e a produção da citocina poderia estar relacionada ao fato de que múltiplos ribossomos podem traduzir uma única molécula de RNAm ao mesmo tempo. Grupos de ribossomos denominados polissomos, permitem a produção simultânea de várias fitas de aminoácidos (polipeptídeos). Esses polipeptídeos podem necessitar de processamentos adicionais ou não para se tornarem maduros e adquirirem uma conformação tridimensional (Scitable-Nature Education).

A produção de IL-1β, IL-18 e TNF-α por células de mulheres não grávidas estimuladas com MSU mostrou-se aumentada alcançando um patamar máximo de produção, que foi semelhante ao nível observado nas gestantes com PE. Esses resultados comprovam que o ácido úrico exerce efeito estimulador sobre a atividade inflamatória dessas células por meio da ativação do inflamassoma. Ao se observar a expressão dos genes que codificam o receptor NLRP3 e a proteína caspase-1, é possível notar que a presença do estímulo com MSU foi capaz de ativá-los, ocasionando o consequente aumento das citocinas inflamatórias IL-1β e IL-18, observado principalmente no grupo MNG. Não houve aumento da expressão e produção de IL-1β após estímulo com MSU, provavelmente pelo fato dos níveis dessa citocina já estarem significativamente aumentados na PE. Siljee et al. (2013) sugerem que níveis séricos aumentados de IL-1β durante o primeiro trimestre da gestação, na ausência de outras proteínas inflamatórias, pode ser considerado um biomarcador precoce do aparecimento da PE e um importante fator patogênico para o desenvolvimento dessa doença.

Monócitos de gestantes normotensas estimulados com MSU, por sua vez, apresentam menor expressão gênica e proteica das citocinas inflamatórias IL-1β, IL-18 e TNF-α em relação ao grupo das gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas. A menor expressão gênica e produção dessas citocinas observadas nas

gestantes normotensas poderiam ser decorrentes da regulação exercida por IL-10 nessas células. O predomínio da citocina anti-inflamatória IL-10 na gestação normal atua na minimização dos efeitos deletérios de uma resposta inflamatória excessiva, sendo capaz de regular a resposta inflamatória que ocorre na gestação pelo controle da expressão gênica de IL-1β e TNF-α. Já é conhecido que a IL-10 exerce um potente efeito inibidor na produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-1β e TNF-α, por monócitos ativados (Moore et al., 2001). Entretanto, na PE essa regulação não ocorre de modo adequado e o balanço encontra-se alterado, com diminuição de IL-10 e aumento de TNF-α (Marzi et al., 1996). Em trabalho anterior demonstrou-se que monócitos de gestantes pré-eclâmpticas produzem níveis endógenos de IL-10 significativamente menores do nas gestantes normotensas, enquanto os valores de TNF-α encontram-se elevados (Cristofalo et al., 2013), corroborando com os achados da literatura (Azizieh et al., 2005).

A expressão dos genes e a produção das citocinas inflamatórias estudadas, com exceção de IL-18, apresentou aumento significativo em monócitos de gestantes pré-eclâmpticas cultivados na ausência de MSU em relação ao grupo das mulheres não grávidas. A pró-IL-18 está presente constitutivamente em monócitos de pessoas saudáveis (Novick et al., 2013), Em vista disso, já era esperado que o aumento na expressão gênica e proteica não fosse tão evidente quanto ao das outras citocinas inflamatórias. A IL-18 também é secretada por meio da ativação do inflamassoma (Dinarello & Fantuzzi, 2003; Dinarello, 2009). Observamos também que houve produção mais intensa de IL-1β do que de IL-18, demonstrada pelos níveis elevados de IL-1β secretados por monócitos dos três grupos estudados. Acredita-se que isso ocorreu porque a IL-18 também estimula a secreção de citocinas de perfil Th2, ou seja, citocinas com atividade anti-inflamatória (Klimkiewicz-Block et al, 2013). Sendo assim, IL-18 induz resposta Th1 e Th2, atuando, dessa maneira, tanto como uma citocina de perfil inflamatório como anti-inflamatório.

A produção de citocinas pró-inflamatórias é um passo crítico para uma efetiva resposta imune inata e também é um mecanismo pelo qual essa resposta influencia o desenvolvimento subsequente da resposta imune adaptativa (Ciraci et al., 2012). IL-1β e IL-18 são exemplos de citocinas chave que não ativam apenas monócitos, macrófagos e neutrófilos, mas também dirigem especificamente o desenvolvimento da resposta imune adaptativa de células T CD4+ em humanos e camundongos. A

diferenciação de células T CD4+ na presença de IL-1β e IL-18 resulta em células Th17 e Th1 efetoras, respectivamente (Chung et al., 2009; Dinarello, 1999; Lasiglie et al., 2011). O perfil predominante de células Th17 sobre células T reguladoras em gestantes portadoras de PE poderia atuar modulando o balanço Th1/Th2 (Darmochwal-Kolarz et al., 2012), sugerindo que tanto a imunidade inata como a adaptativa estão envolvidas na resposta inflamatória excessiva que ocorre nessa patologia obstétrica (Toldi et al., 2011).

A expressão gênica de TNF-α, endógena e estimulada com MSU, foi maior em monócitos de gestantes com PE em relação às gestantes normotensas e mulheres não grávidas, enquanto a produção da citocina foi significativamente maior em relação ao grupo GN. Essa maior produção de TNF-α por monócitos de gestantes pré-eclâmpticas corrobora resultados anteriores da literatura (Beckmann et al., 2004; Peraçoli et al., 2007) e confirma estudos prévios de nosso laboratório (Peraçoli et al. 2011; Cristofalo et al., 2013), demonstrando que níveis séricos elevados de ácido úrico se correlacionam com maior produção de TNF-α e radicais livres liberados por monócitos em gestantes portadoras de PE comparadas a gestantes normotensas (Peraçoli et al., 2011).

Os níveis elevados de TNF-α em gestantes pré-eclâmpticas poderiam ativar o complexo inflamassoma pelo seu efeito estimulador sobre o fator de transcrição nuclear-κB. A síntese de TNF-α, bem como da IL-1β é regulada, em parte, pelo NF-κB, que está mais ativo em células de gestantes com PE (Giorgi et al, 2012). Esse fator de transcrição regula a transcrição de genes relacionados à inflamação (Matsusaka et al, 1993; Striz et al, 2011) e o TNF-α, por sua vez, age estimulando a ativação de NF-κB, mantendo um ciclo de ativação celular (Vallabhapurapu & Karin, 2009). Sendo assim, apesar de não estar diretamente relacionada com o inflamassoma, TNF-α é uma importante citocina inflamatória produzida no primeiro sinal de ativação desse complexo multiproteico.

A ativação dos inflamassomas requer dois sinais. O primeiro sinal consiste na ativação do receptor TLR, fato que ocasiona a produção de pró-IL-1β e pró-IL-18, assim como a hiper-regulação da transcrição e tradução de moléculas como NLRP3. Adicionalmente, sinais fornecidos por ativadores de NF-κB são necessários, porém não suficientes para a ativação de NLRP3 e, um segundo estímulo, como danos induzidos por cristais, é requerido para a ativação de NLRP3 (Bauernfeind et al.,

2009). O segundo sinal está relacionado com a montagem e ativação do inflamassoma e pode ser ativado por uma variedade de estímulos (Martinon et al., 2009), dentre eles o MSU. Segundo Bauernfeind et al. (2009) a necessidade dessa dupla estimulação para ativar o inflamassoma poderia ser importante para impedir a ativação descontrolada de NLRP3, responsável por consequências devastadoras no hospedeiro, como ocorre em doenças auto inflamatórias.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho mostram que monócitos de gestantes portadoras de PE apresentam ativação endógena dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e secretam níveis mais elevados de IL-1β, IL-18 e TNF-α. O estímulo de monócitos com MSU, induzindo maior expressão gênica do receptor NLRP3 e caspase-1, bem como a produção de IL-18 foi mais evidente nos grupos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas e demonstra o papel do ácido úrico na ativação do inflamassoma NLRP3 e na liberação de citocinas inflamatórias, sugerindo a participação desse complexo inflamatório na patogênese da pré-eclâmpsia.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman A, Pillai S. Imunidade inata. In:Imunologia Celular e Molecular. Elsevier, 7ª.ed, 2012; p55-68.

Abrahams VM. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. J Reprod Immunol. 2011; 88(2):112-7.

American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin no. 33. Washington, DC.: ACOG; 2002; 2:229–35.

Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2005; 54(1):30-7.

Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. Placenta. 2008; 29:S67–S72.

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappa B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J Immunol. 2009; 183(2):787-91.

Beckmann I, Efraim SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. Hypertens Pregnancy. 2004; 23(3):319-29.

Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. Semin Fetal Neonatal Med. 2006; 11(5):309-16.

Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968; 97:77-89.

Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. Reproduction. 2010; 140(6):803-13.

Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. Immunity. 2009; 30(4):576-587.

Ciraci C, Janczy JR, Sutterwala FS, Cassel SL. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. Microbes Infect. 2012; 14(14):1263-70.

Conforti-Andreoni C, Spreafico R, Qian HL, Riteau N, Ryffel B, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. Uric acid – drivem Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. J Immunol. 2011. 187(11):5842-50.

Costa RAA, Peraçoli JP, Magalhães, CG, Bannwart-Castro CF, Martins AMVC, Peraçoli MTS. Association between renal dysfunction and angiogenic factors in preeclampsia. Pregnancy Hypertension.2012; 3:252.

Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzelak B, Oleszczuk J. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. J Reprod Immunol. 2012; 93(2):75-81.

Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflamation, and associated diseases. Annu Rev Immunol. 2011; 29:707-735.

De Oliveira LG, Karumanchi A, Sass N. Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. Rev Bras Ginecol Obst. 2010; 32(12):609-16.

Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. J Infect Dis. 2003; 187 Suppl 2: S370-84.

Dinarello CA. IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. J Allergy Clin Immunol. 1999, 3(1Pt 1):11-24.

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol. 2009; 27:519-50.

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature. 2010; 464(7293):1357-61.

Eder C. Mechanisms of interleukin-1β release. Immunobiology. 2009; 214(7):543-53.

Erskine KJ, Iversen SA, Davies R. An altered ratio of 18:2 (9,11) to 18:2 (9,12) linoleic acid in plasma phospholipids as a possible predictor of pre-eclampsia. Lancet 1985;1(8428):554-5.

Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. Nat Immunol. 2009; 10(3):241-7.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Biochem J. 2004; 384(Pt 2):201-232.

Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF-κb pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. J Reprod Immunol. 2012; 95(1-2):67-72.

Grishman EK, White PC, Savani RC. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1β in the development and progression of type 1 diabetes. Pediatr Res. 2012; 71(6):626-32.

Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P, Sooranna SR, Steer PJ. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction? Br J Obstet Gynaecol. 2002; 109(7):836-9.

Kang DH, Finch J, Nakagawa T, Karumanchi SA, Kanellis J, Granger J, Johnson RJ. Uric acid, endothelial dysfunction and preeclampsia: searching for a pathogenetic link. J Hypertens. 2004; 22(2):229-35.

Kharb S, Gulati N, Singh V, Singh GP. Superoxide anion formation and glutathione levels in patients with preeclampsia. Gynecol Obstet Invest. 2000; 49(1):28-30.

Kharfi A, Giguère Y, De Grandpré P, Moutquin JM, Forest JC. Human chrorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. Clin Biochem. 2005; 38(8):717-21.

Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, Nien JK, Gomez R, Mazor M, Saito S, Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? Am J Obstet Gynecol. 2005; 193(3 Pt 2):921-7.

Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout..J Inflamm Res. 2011; 4:39-49.

Klimkiewicz-Blok D, Florjański J, Zalewski J, Blok R. Analysis of the concentrations of interleukin 18 in amniotic fluid in the second and the third trimesters of pregnancy. Adv Clin Exp Med. 2013; 22(5):699-703.

Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. Reprod Sci. 2008; 15(3):231-42.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. Nat Med. 2005; 11(6):653-60.

Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, Núñez G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. J Leukoc Biol. 2007; 82(2):220-5.

Larionov, A., Krause, A., Miller, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinform. 2005; 6:62.

Lasiglie D, Traggiai S, Federici M, Alessio M, Buoncompagni A, Accogli A, Chiesa S, Penco F, Martini A, Gattorno M. Role of IL-1beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients. Plos One. 2011; 6:e20014.

Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A, Van der Post JA. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 2009; 61(5):346-59.

Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. Clin Immunol. 2006; 118(2-3):268-75.

Martin AC, Brown MA. Could uric acid have a pathogenic role in pre-eclampsia? Nat Rev Nephrol. 2010; 6(12):744–8.

Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature. 2006; 440(7081):237–41.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. Annu Rev Immunol. 2009; 27:229-65.

Marzi M; Vigano A; Trabattoni D; Villa ML; Salvaggio A, Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. Clin Exp Immunol. 1996; 106(1):127-33.

Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90(21):10193-7.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science. 2002; 296(5566):301-5.

Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstettre A, Agostini A, Capelle M, Mege JL, Bretelle F. Preeclampsia: impaired inflammatory response mediated by Toll-like receptors. J Reprod Immunol. 2008; 78(1):80-3.

Moore KW, de WaalMalefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 andthe interleukin-10 receptor. Annu. Rev Immunol. 2001; 19:683-765.

Mulla MJ, Myrtolli K, Potter J, Boeras C, Kavathas PB, Sfakianaki AK, Tadesse S, Norwitz ER, Guller S, Abrahams VM. Uric acid induces trophoblast IL-1β production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia .Am J Reprod Immunol. 2011; 65(6):542-8.

Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. Hypertens Pregnancy. 2000; 19(2):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(1):S1-S22.

Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. Semin Immunol. 2013; 25(6):439-48.

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J Biol Chem. 2001; 276(13):10229-33.

Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. J Biol Chem. 2004; 279(9):7370-7.

Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2007; 57(3):177-85.

Peraçoli MT, Menegon FT, Borges VT, de Araújo Costa RA, Thomazini-Santos IA, Peraçoli JC. Platelet aggregation and TGF-beta1 plasma levels in pregnant women with preeclampsia. J Reprod Immunol. 2008; 79(1):79-84.

Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased Reactive Oxygen Species and Tumor Necrosis Factor-Alpha Production by Monocytes are Associated with Elevated Levels of Uric Acid in Pre-Eclamptic Women. Am J Reprod Immunol. 2011; 66(6):460-7.

Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. J Reprod Immunol. 2013; 100(2):129-34.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. Annu Rev Immunol. 2004; 22:929-79.

Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP-3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Different. 2007; 14(9):1583–9.

Pontillo A, Girardelli M, Agostinis C, Masat E, Bulla R, Crovella S. Bacterial LPS differently modulates inflammasome gene expression and IL-1β secretion in trophoblast cells, decidual stromal cells, and decidual endothelial cells. Reprod Sci. 2013; 20(5):563-6.

Pontillo A, Reis EC, Bricher PN, Vianna P, Diniz S, Fernandes KS, Chies JA, Sandrim V. NLRP1 L155H Polymorphism is a Risk Factor for Preeclampsia Development. Am J Reprod Immunol. 2014. doi: 10.1111/aji.12353.

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1999; 180(2 Pt 1):499-506.

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Science. 2005; 308(5728):1592-4.

Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. Placenta. 2003; 24(suppl A):S21-S27.

Rein DT, Breidenbach M, Hönsheid B, Friebe-Hoffmann U, Engel H, Göhring UJ et al. Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro. Cytokine. 2003; 23(4-5):119-25.

Reisetter AC, Stebounova LV, Baltrusaitis J, Powers L, Gupta A, Grassian VH, Monick MM. Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. J Biol Chem. 2011; 286(24):21844-52.

Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. Lancet. 2001; 357(9249):53-6.

Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. Semin Reprod Endocrinol. 1998; 16(1):5-15.

Rock KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. Nat Rev Rheumatol. 2013; 9(1):13-23.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. Cell; 2010; 140(6):821-32.

Schuiling GA, Koiter TR, Faas MM. Why pre-eclampsia? Hum Reprod. 1997; 12(10):2087-91.

SCITABLE-NATURE EDUCATION. Disponível em: http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-information-in-dna-determines-cellular-function-6523228. Acesso em: 15 janeiro 2015.

Segovia J, Sabbah A, Mgbemena V, Tsai SY, Chang TH, Berton MT, Morris IR, Allen IC, Ting JP, Bose S. TLR2/MyD88/NF-κB pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. Plos One. 2012; 7(1):e29695.

Siljee JE, Wortelboer EJ, Koster MP, Imholz S, Rodenburg W, Visser JH, de Vries A, Schielen PC, Pennings JL. Identification of interleukin-1 beta, but no other inflammatory proteins, as an early onset pre-eclampsia biomarker in first trimester sérum by bead-based multiplexed immunoassays. Prenat Diagn. 2013; 33(12):1183-8.

Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Liu XD, Brabcova I, Sekerkova A, Poole JA, Jaresova M, Slavcev A, Rennard SI. Epithelial cells modulate genes associated with NF kappa B activation in co-cultured human macrophages. Immunobiology. 2011; 216(10):1110-6.

Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease.Nature. 2012; 481(7381): 278-86.

Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Okira S, Konishi I. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. Virchows Arch 2004; 444(1): 49-55.

Toldi G, Rigó J Jr, Stenczer B, Vásárhelyi B, Molvarec A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2011; 66(3):223-9.

Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. Annu Rev Immunol. 2009;27:693-733.

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(4):e1865.

Visser N, van Rijn BB, Rijkers GT, Franx A, Bruinse HW. Inflammatory changes in preeclampsia: current understanding of the maternal innate and adaptive immune response. Obstet Gynecol Surv. 2007; 62(3):191-201.

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

Zhuang HM, Wang KF, Miyata T, Wu ZJ, Xie LH. Identification and expression of caspase-1 gene under heat stress in insecticide-susceptible and-resistant Plutellaxylostella (Lepidoptera: Plutellidae). MolBiol Rep. 2011; 38(4):2529-39.

Zou J, Crews FT. Inflammasome-IL-1β signaling mediates ethanol inhibition of hippocampal neurogenesis. Front Neurosci. 2012; 6:77.

Capítulo II

Esse capítulo foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista PLOS ONE, para a qual foi submetido.

UOL MAIL

Submission Confirmation for PONE-D-15-03754 - [EMID:29a9b4340bf026cb]

De: PLOS ONE
Para: tperacoli@uol.com.br
Cópia:
Cópia oculta:
Assunto: Submission Confirmation for PONE-D-15-03754 - [EMID:29a9b4340bf026cb]
Data: 26/01/2015 10:38

PONE-D-15-03754
Endogenous and Uric Acid-induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia
PLOS ONE

Dear Prof. Peracoli,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Endogenous and Uric Acid-induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia" to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-15-03754.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at http://pone.edmgr.com/.

Please visit EveryONE (http://blogs.plos.org/everyone), the PLOS ONE community blog for our published authors and readers, to find out what the journal is thinking, changing and doing.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,
PLOS ONE

⚠ Lembre-se: sua senha de acesso no UOL Mail é secreta; não a informe a ninguém.
O UOL Mail jamais solicitará sua senha por e-mail ou por telefone. Trocar senha.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Botucatu, January 26, 2015

Norbert Gleicher
Editor-in-Chief
PLOS ONE

We would like to submit the manuscript "**Endogenous and Uric Acid-induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia**" to the Editorial Board of PLOS ONE. The data included in this paper represent an original work that has not been published previously and it is not currently being considered by another journal. Each author has seen and approved the contents of the submitted manuscript.

Thank you very much for your attention.

Corresponding author: Maria Terezinha S. Peraçoli
Department of Microbiology and Immunology – IB – UNESP – Botucatu, SP, Brazil.
E-mail: tperacoli@.uol.com.br
Phone: 55 14 3880-0430

PLOS ONE

Endogenous and Uric Acid-induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Endogenous and Uric Acid-induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia
Short Title:	NLRP3 activation in preeclampsia
Corresponding Author:	Maria Terezinha Peracoli, Ph.D. Sao Paulo State University Botucatu, BRAZIL
Keywords:	preeclampsia, monocytes, inflammasome, cytokines
Abstract:	Preeclampsia (PE) is a specific syndrome of pregnancy, characterized by hypertension and proteinuria. This pathology is associated with hyperuricemia and elevated serum levels of inflammatory cytokines. Uric acid crystals may activate an intracellular complex called inflammasome, which is important for processing and release of inflammatory cytokines. This study investigated the state of monocyte activation, both endogenous and stimulated with monosodium urate (MSU), by gene expression of NLRP1 and NLRP3 receptors as well as their association with inflammatory cytokines expression. Monocytes were obtained from peripheral blood of 23 preeclamptic pregnant women, 23 normotensive pregnant women (NT) and 23 healthy non-pregnant women (NP). Inflammasome activation was evaluated by the gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β, IL-18 and TNF-α by RT-qPCR in unstimulated monocytes (endogenous expression), or after cell stimulation with MSU (stimulated expression). The concentration of cytokines was assessed by ELISA. In preeclamptic pregnant women, gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β and TNF-α by monocytes stimulated or not with MSU was significantly higher than in NT and NP groups. Stimulation of monocytes from preeclamptic and non-pregnant women with MSU induced increased gene expression of NLRP3, caspase-1 and TNF-α in relation to the endogenous expression in these groups, while this was not observed in the NT group. The cytokine determination showed that monocytes from women with PE produced higher endogenous levels of IL-1β, IL-18 and TNF-α compared to the other groups, while the stimulus with MSU led to higher production of these cytokines in preeclamptic group than in the NT group. In conclusion, the results showed increased basal gene expression of NLRP1 and NLRP3 receptors in monocytes from PE group. These cells stimulation with MSU demonstrates that uric acid plays a role in NLRP3 inflammasome activation, suggesting the participation of this inflammatory complex in the pathogenesis of preeclampsia.
Order of Authors:	Mariana Leticia Matias
	Mariana Romao
	Ingrid Cristina Weel
	Vanessa Rocha Ribeiro
	Priscila Rezeck Nunes
	Vera Therezinha Borges
	Joao Pessoa Araujo Jr
	Jose Carlos Peracoli
	Leandro Gustavo de Oliveira
	Maria Terezinha Peracoli, Ph.D.
Opposed Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Endogenous and Uric Acid-induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia

Mariana L. Matias[1]; Mariana Romão[2]; Ingrid C. Weel[2]; Vanessa R. Ribeiro[2]; Priscila R. Nunes[2]; Vera T. M. Borges[1]; João P. Araújo Junior[2]; José C. Peraçoli[1]; Leandro G. de Oliveira[1]; Maria Terezinha Peraçoli[2]

[1]Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

[2]Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

* Corresponding author

Email: tperacoli@uol.com.br (MTP)

Short title: NLRP3 activation in preeclampsia

Abstract

Preeclampsia (PE) is a specific syndrome of pregnancy, characterized by hypertension and proteinuria. This pathology is associated with hyperuricemia and elevated serum levels of inflammatory cytokines. Uric acid crystals may activate an intracellular complex called inflammasome, which is important for processing and release of inflammatory cytokines. This study investigated the state of monocyte activation, both endogenous and stimulated with monosodium urate (MSU), by gene expression of NLRP1 and NLRP3 receptors as well as their association with inflammatory cytokines expression. Monocytes were obtained from peripheral blood of 23 preeclamptic pregnant women, 23 normotensive pregnant women (NT) and 23 healthy non-pregnant women (NP). Inflammasome activation was evaluated by the gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β, IL-18 and TNF-α by RT-qPCR in unstimulated monocytes (endogenous expression), or after cell stimulation with MSU (stimulated expression). The concentration of cytokines was assessed by ELISA. In preeclamptic pregnant women, gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β and TNF-α by monocytes stimulated or not with MSU was significantly higher than in NT and NP groups. Stimulation of monocytes from preeclamptic and non-pregnant women with MSU induced increased gene expression of NLRP3, caspase-1 and TNF-α in relation to the endogenous expression in these groups, while this was not observed in the NT group. The cytokine determination showed that monocytes from women with PE produced higher endogenous levels of IL-1β, IL-18 and TNF-α compared to the other groups, while the stimulus with MSU led to higher production of these cytokines in preeclamptic group than in the NT group. In conclusion, the results showed increased basal gene expression of NLRP1 and NLRP3 receptors in monocytes from PE group. The stimulation with MSU demonstrates that uric acid plays a role in NLRP3 inflammasome activation, suggesting the participation of this inflammatory complex in the pathogenesis of preeclampsia.

Keywords: preeclampsia, monocytes, inflammasome, cytokines

Introduction

Preeclampsia (PE) is a specific syndrome of human pregnancy, and the leading cause of morbidity, mortality and premature delivery between 2 and 7% of pregnancies [1]. The clinical diagnosis is based on the development of hypertension (BP ≥ 140 x 90 mmHg) and proteinuria (≥300 mg/24 h) [2] that occurs from the 20th week of pregnancy or in the first days after birth [3].

It has been reported that PE is characterized by severe systemic inflammatory response, endothelial cell dysfunction, platelet aggregation, coagulation system activation and increased generalized vascular resistance [4], [5], which appear to contribute significantly to the pathophysiology of the disease [6]. Therefore, in PE it is observed activation of inflammatory cells such as monocytes and granulocytes, and endothelial cells [5], [7], excessive production of proinflammatory cytokines [8]-[11] as well as lower production of regulatory cytokines such as Interleukin -10 (IL-10), and transforming growth factor (TGF-β) [12], [13].

The excessive activation of intravascular monocytes/macrophages and granulocytes in PE suggests that innate immune system activation can negatively influences the pregnancy progress. Monocytes from women with PE are endogenously activated and release significantly higher concentrations of tumor necrosis factor alpha (TNF-α), superoxide anion and hydrogen peroxide compared to monocytes from normotensive pregnant women. These results confirm that PE is characterized by oxidative stress and that maternal circulating monocytes may represent an important source of free radicals and cytokines during the inflammatory disease [11], [14]. Peripheral blood leukocyte activation state in pregnant women with PE is associated with genes related to inflammation [15]. There is an association between increased activation of nuclear transcription factor kappa B (NF-KB) and higher production of TNF-α and IL-1β by mononuclear cells of preeclamptic pregnant women as compared with normotensive pregnant women [16]. Recently, we reported that monocytes from women with PE are classically activated and produce higher levels of the inflammatory cytokines TNF-α and IL-12 associated with higher expression of TLR4 and CD64 surface markers. These results provide evidence that the systemic inflammatory environment in PE may differentiate and polarize the monocytes to the M1 phenotype [17].

Hyperuricemia has been observed in women with PE associated with the disease severity [18]. Positive correlation between increased production of TNF-α, superoxide anion and elevated serum uric acid level was observed in PE [14]. Also, high association between plasma levels of uric acid, heat shock protein 70, IL-1β, IL-12 and TNF-α has been reported in severe cases of PE [19]. Thus, high levels of uric acid in the plasma of patients with PE may represent a direct contribution to the pathogenesis of PE by its potential to promote inflammation [20] due to its association with proinflammatory cytokines.

Uric acid (monosodium urate-MSU) crystals may activate an intracellular complex called inflammasome, a multi-protein structure which is important for processing and release of IL-1β and IL-18 [21], [22]. Inflammasome formation depends on receptors known as pattern recognition receptors (PRRs) expressed by cells of the innate immune system, such as monocytes, macrophages and dendritic cells [23], [24]. Among the various PRRs, nod-like intracellular receptors with a pyrin domain (NLRP), are responsible for inflammasome formation in response to pathogens known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) contributing to the host defense against infections [25] or also bind endogenous products of host cells, named danger-associated molecular patterns (DAMPs) [23], [26], [27]. Three NLR proteins have been identified to form inflammasome: NLRP1, NLRP3 and NLRC4 [22]. The NLRP3 inflammasome is the most studied inflammasome, and capable of sensing a wide variety of alarm signals [28]. In addition, some evidence indicates that NLRP3 plays an important role in inflammatory diseases such as atherosclerosis, gout, type I and type 2 diabetes [22], [29], [30]. After interaction with the ligand, several NLRP3 identical proteins form an oligomer and each NLRP3 of the oligomer binds to an adapter protein called ASC (apoptosis-associated speck-like protein). This binds to the inactive precursor form of caspase-1 enzyme, which becomes active and cleaves pro-IL-1β, resulting in biologically active IL-1β generation which subsequently is secreted into the extracellular medium [31], [32].

Several endogenous molecules, considered “danger signals” such as MSU crystals, ATP, β-amyloid or hyaluronan) when in high concentrations, induce NLRP3 inflammasome activation, playing an important role in inflammatory diseases [27]. Conforti-Andreoni and colaborators [33] reported the importance of uric acid, together with the signaling pathway of the nuclear transcription factor-kB (NF-kB), in the

inflammasome activation of dendritic cells as well as IL-1β and IL-18 production. According to Rock and colaborators [34], uric acid plays a pathophysiological role as a local alarm signal that alerts the immune system against cellular injury and aids in the development of innate and adaptive immune responses.

The NLRP3 receptor is described as uric acid sensor that induces IL-1β production in trophoblast cell lines. Thus, hyperuricemia associated to the PE could be related to activation of the NLRP3 inflammasome in trophoblast, thereby increasing the IL-1β levels in the placenta and contributing to the pathogenesis of PE [35]. Recently, a study of polimorphisms in inflammasome genes was analyzed in preeclamptic women, and showed association of NLRP1 variant rs12150220 (L155H) with development of preeclampsia, suggesting a role of this inflammasome receptor in the pathogenesis of this disorder [36].

Considering that high levels of uric acid are often observed in pregnancies complicated by PE, and are associated with oxidative stress and elevated levels of IL-1β and TNF-α produced by monocytes, the present study aimed to evaluate the role of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes in endogenous or monosodium urate-induced activation of monocytes from pregnant women with PE. Gene expression of NLRP1 and NLRP3 receptors as well as their association with IL-1β, TNF-α and IL-18 production by these cells were determined.

Material and Methods

Study population

This study consisted of 46 pregnant 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 March 2013 and October 2014. Twenty three women were diagnosed with preeclampsia (PE), defined as a persistent elevated blood pressure value of 140x90 mmHg and proteinuria (≥ 300 mg in urine collected during 24 hours) after the 20th weeks of gestation [2], and 23 pregnant women with an uncomplicated pregnancy that remained normotensive (NT) and nonproteinuric throughout pregnancy were recruited as controls and matched for gestational age with the preeclamptic group. A group of 23 non-pregnant women (NP) was added to establish the comparison of immunological parameters between groups. Gestational age was calculated from the

last menstrual period and confirmed by ultrasound dating. Non-pregnant women were voluntary donors of the Blood Bank of the Hemocenter of the Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil. Proteinuria in 24-hour urine was measured by a colorimetric method, the Technicon RAXT automation system, and uric acid was assessed by uric acid enzymatic Trinder (Biotrol Diagnostic) in the Clinical Laboratory, Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil. Exclusion criteria for the three groups included chronic hypertension, multiple gestation, prior preeclampsia, illicit drug use, and preexisting medical conditions such as diabetes, cancer, acute infectious disease, cardiovascular, autoimmune, renal and hepatic diseases. The study was approved by the Ethics Committee of the Botucatu Medical School, and informed consent was obtained from all women involved in the study.

Blood sampling

The whole blood for evaluation of gene expression and cytokine production by monocytes from pregnant women with PE was collected at the time of disease diagnosis, and from normotensive pregnant women at the time they were matched for gestational age with pregnant women with PE. The blood of non-pregnant women was obtained during blood donation. Blood samples obtained from the antecubital vein were put into a plastic tube containing 5% EDTA.

Isolation and culture of monocytes

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) according to the method described by Boyum [37]. Briefly, 10 mL of blood was mixed with an equal volume of RPMI 1640 tissue culture medium (Sigma-Aldrich, Chemical Co., St Louis, Missouri, USA) containing 2 mM L-glutamine, 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 20 mM HEPES, and 40 µg/mL gentamicin (complete medium). Samples were layered over 5 mL Ficoll-Paque Premium in a 15 mL conical plastic centrifuge tube. After centrifuging at 400 g for 30 minutes at room temperature, the interface layer of PBMC was carefully aspirated and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05 mM ethylenediaminetetraacetic acid (PBS-EDTA) and once with complete medium, with

centrifugation in between washes at 300 g for 10 minutes. Cell viability, as determined by 0.2 % Trypan Blue dye exclusion, was >95 % in all experiments. Monocytes were counted using neutral red (0.02 %) in PBMC suspension and a suspension of $5x10^5$ monocytes/mL in complete medium was employed for gene expression and cytokines determination.

Monocyte culture supernatants

Monocyte suspensions ($5x10^5$ cells/mL) were distributed (1 mL/well) in 24-well flat-bottomed plates (Greiner Bio-One, Germany). After incubation for 2 h at 37 ^oC in a humidified 5 % CO_2 atmosphere, non-adherent cells were removed by aspiration and each well rinsed twice with complete medium. Monocyte preparations routinely contained >90 % monocytes as determined by morphologic examination and staining for nonspecific esterase [38]. Monocytes were incubated with complete medium in the presence or absence of 50 µg/mL of monosodium urate (MSU) (Invivogen, San Diego, CA, USA) for 18 h at 37 ºC in 5 % CO_2. The MSU concentration used as stimulus in monocyte cultures was previously standardized employing monocytes from five health non-pregnant women. Culture supernatants were harvested and stored at -80 ^oC for cytokine determination.

Cytokine determination

Cytokine concentrations in monocyte culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for TNF-α and IL-1β according to the manufacturer's instructions. Assay sensitivity limits were 1.6 pg/mL for TNF-α and 1.0 pg/mL for IL-1β. For IL-18 quantification, a quantitative test ELISA kit for human IL-18 (MBL – Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan) with sensitivity of 12.5 pg/mL was employed.

Evaluation of the expression of transcripts related to inflammation

Monocytes were subjected to analysis of the expression on the transcriptional level of the gene encoding the proteins NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β, IL-18 and TNF-α. Total RNA was extracted from monocytes through the system Total RNA

Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, Canada) according to manufacturer's protocol. After extraction, to ensure complete removal of genomic DNA, 1 µg of total RNA was incubated with DNAse I Amp Grade (Invitrogen). The purity and relative quality of all samples of total RNA obtained were determined by fluorometry using the equipment Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies). Subsequently, the synthesis of complementary DNA (cDNA) for performing the polymerase chain reaction coupled reverse transcription (Reverse Transcription-coupled polymerase chain reaction - RT-PCR) was conducted with 450 ng of total RNA in 60 µL reaction using ImProm- IITM Reverse Transcription System, according to manufacturer's protocol.

The quantification of gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β, IL-18 and TNF-α was made through the reaction technique in quantitative Polymerase Chain in real time (RT-qPCR) using RT GoTaq® -qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). The device used was 7500 Fast Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA).

The variants of the targets studied were aligned in the MEGA 5.1 program and subsequently each primer was selected by the software Primer-BLAST. Primers located in exon-exon junction guarantee the purity of the reaction, namely the absence of any genomic DNA that may contaminate it. The primer sequences used in this study are in table 1.

Table 1. Primers for inflammasomes proteins, cytokines and GAPDH.

Gene	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' – 3')	GeneBank
NLRP1	(1728)TCCGGCTCCCATTAGACAGA(1747)	(1810)AGACCCATCCTGGCTCATCT(1791)	NM_033004.3
NLRP3	(2826)GAGGAAAAGGAAGGCCGACA(2845)	(2917)TGGCTGTTCACCAATCCATGA(2897)	NM_004895.4
Caspase-1	(1065)AGACATCCCACAATGGGCTC(1084)	(1172)TGAAAATCGAACCTTGCGGAAA(1151)	NM_033292.3
IL-1β	(544)GAGCAACAAGTGGTGTTCTCC(564)	(653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)	NM_000576.2
IL-18	(438)ACTGTAGAGATAATGCACCCCG(459)	(517)AGTTACAGCCATACCTCTAGGC(496)	NM_001562.3
TNF-α	(325)GCTGCACTTTGGAGTGATCG(344)	(462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)	NM_000594.3
GAPDH	(684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703)	(801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	NM_002046.4

Each reaction was set in duplicate in a total of 20 µL each, which contains 0,3 µM of each primer (*forward and reverse*), 2 µL of cDNA, 10 µL of master mix and 6,8 µL of nuclease-free water. Additionally, was inserted a control, also in duplicate, which was included in each reaction in order to prove that there is no contamination.

The conditions for the RT-qPCR reactions were: initial denaturation at 96 °C - 2 min and then 40 cycles at 95 °C- 15 s and 60 °C -60 s, followed by a melting curve. The amplification of each particular transcript was confirmed by melting curve generated profile of the end of each reaction.

Expression values of the analyzed transcripts were normalized based on the concurrent analysis of the expression 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 to a standard curve [39]. All conditions, including GAPDH for each sample and the negative control reaction (*No Template Control* - NTC, absence of RNA) were analyzed in duplicates. To analyze the relative expression, after the analysis of gene expression, we chose an RNA sample obtained from each group, which received the relative value of 100. All other samples received values for that sample.

Statistical analysis

Statistical significance was evaluated by the non-parametric methods, Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney *U* test, using the statistical program INSTAT, Graph Pad, San Diego, California. Differences between the groups studied were considered statistically significant when the $p<0.05$.

Results

Demographic and clinical characteristics

No difference in age, gestational age, race and parity parameters among preeclamptic, normotensive and non-pregnant women was observed (Table 2). Systolic and diastolic blood pressure as well as serum uric acid concentration were significantly higher in pregnant women with PE compared with normotensive pregnant and non-pregnant women. Additionally, proteinuria levels were significantly higher in pregnant women with PE than in normotensive pregnant women.

Table 2. Demographic and clinical characteristics of pregnant women with preeclampsia, normotensive pregnant women and non-pregnant women.

Characteristics	Pregnant women with preeclampsia (n = 23)	Normotensive pregnant women (n = 23)	Non-pregnant women (n = 23)
Age (years)	25 (14 – 41)	25 (13 – 43)	24 (21 – 42)
Race			
White (%)	84.6	91.3	87.0
Non-white (%)	15.4	8.7	13.0
Gestational age (weeks)	35 (24 – 40)	34 (23 – 39)	N/A
Parity			
Nulliparous (%)	63	68	N/A
Multiparous (%)	37	32	
Systolic Blood Pressure (mmHg)	160 # (140 – 200)	110 (90 – 112)	114 (100 – 120)
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	110 # (90 – 120)	69 (63 – 70)	70 (65 – 80)
Proteinuria (mg / 24h)	1540 * (300 – 19 880)	< 300	N/A
Uric acid (mg/dL)	5.9 # (4.5 – 10.1)	3.8 (2.2 – 4.6)	4.1 (2.8 – 4.8)

Data are presented as median, with the minimum and maximum values in parentheses, or as percentage. N/A = not applicable. * ($p < 0.05$) vs normotensive pregnant women (Mann-Whitney *U* test); # ($p < 0.05$) vs normotensive pregnant women and non-pregnant women (Kruskal-Wallis test).

Expression of genes related to inflammasome in monocytes from pregnant and non-pregnant women

Figures 1A, 1B and 1C show, respectively, higher gene expression of NLRP1, NLRP3 receptors and caspase-1 in monocytes from pregnant women with PE, stimulated or not with MSU, when compared to NT and NP groups. Lower expression of these genes was detected in monocytes from normotensive pregnant women both stimulated or not with MSU, compared to NP group. In preeclamptic pregnant and NP groups, MSU induced higher expression of NLRP3 receptor and caspase-1 compared to endogenous levels of this mRNA in monocytes from these groups. There was a tendency to an increase in NLRP1 mRNA expression in cells of pregnant women with PE stimulated with MSU compared with non-stimulated cells, but this difference was not significant.

The results also showed that the transcriptional profile of NLRP3 receptor was more elevated than the NLRP1 one, in monocyte from pregnant women with PE and in non-pregnant women.

Figure 5. Gene expression of NLRP1 (A), NLRP3 (B) and caspase-1 (C) in monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), stimulated or not with MSU. * $p<0.05$ vs. NT and NP; # $p<0.05$ vs. NP; † $p<0.05$ vs. PE MSU+. @ $p<0.05$ vs. NP MSU+.

Figure 2A represents higher gene expression of IL-1β in monocytes from pregnant women with PE, stimulated or not with MSU, when compared to NT and NP groups. On the other hand, lower expression of IL-1β gene is observe in monocytes from normotensive pregnant women, stimulated or not with MSU, compared to NP group. There was no difference between IL-1β mRNA levels from endogenous and stimulated with MSU monocytes cultures for the three groups.

Endogenous gene expression of IL-18 in monocytes from preeclamptic pregnant women was significantly higher than in the NT group (Figure 2B). After MSU stimulation monocytes from women with PE expressed higher IL-18 mRNA as compared to NT and NP groups. Cells from NT group stimulated with MSU had lower gene expression of this cytokine in relation to NP group. In addition, IL-18 gene expression in monocytes from pregnant women with PE stimulated with MSU (MSU+) was significantly higher compared to non-stimulated cells (MSU-).

Figure 6. Gene expression of IL-1β (A) and IL-18 (B) in monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), stimulated or not with MSU. * p<0.05 vs. NT and NP; # p<0.05 vs. NP; ■ p<0.05 vs. NT; † p<0.05 vs. PE MSU+.

Figure 3 shows an intense increase in gene expression of TNF-α in monocytes from pregnant women with PE, cultured with and without MSU, when compared to NT and NP groups. In normotensive pregnant women group, the stimulation with MSU did not alter the lower expression of TNF-α by monocytes compared to NP group. Furthermore, there is significant difference between pregnant women with PE and non-pregnant women in relation to TNF-α gene expression in monocytes stimulated or not with MSU.

Figure 7. Gene expression of TNF-α in monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), stimulated or not with MSU. * p<0.05 vs. NT and NP; # p<0.05 vs. NP; † p<0.05 vs. PE MSU+; @ p<0.05 vs. NP MSU+.

Cytokine production by monocytes from pregnant and non-pregnant women

The production of IL-1β, IL-18 and TNF-α cytokines in monocytes from 23 pregnant women with PE, 23 normotensive pregnant women and 23 healthy non-pregnant women, stimulated or not with monosodium urate (MSU) is shown in Figures 4A, 4B and 5 respectively.

There is an increase in the endogenous concentration of IL-1β produced by monocytes from pregnant women with PE compared to NT and NP groups. The MSU stimulation induced higher production of IL-1β by cells from preeclamptic pregnant women compared to NT group. It is also possible to notice a decrease in cytokine expression in monocytes from normotensive pregnant women stimulated with MSU compared to the NP group (Figure 4A). However, there is significant difference between the production of IL-1β by monocytes from NT groups and NP that were stimulated with MSU (MSU+) and the basal production of these cells. There was a tendency to increase levels of IL-1β produced by monocytes from the preeclamptic

group, when the cells were stimulated with MSU compared to unstimulated cells, but this difference did not reach statistical significance.

Figure 4B shows a significant increase in endogenous and MSU-stimulated protein concentration of IL-18 produced by monocytes from pregnant women with PE, compared with the NT group. Monocytes from NT group, cultured with or without MSU, produced lower levels of this cytokine compared to the NP Group. In addition, there was significant difference between endogenous and MSU-stimulated IL-18 production both in preeclamptic and NP groups.

Figure 8. IL-1β (A) and IL-18 (B) production by monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), stimulated or not with MSU. * $p<0.05$ vs. NT and NP; # $p<0.05$ vs. NP; ■ $p<0.05$ vs. NT; † $p<0.05$ vs. PE MSU+; ¤ $p<0.05$ vs. NT MSU+; @ $p<0.05$ vs. NP MSU+.

In Figure 5 it is observed higher endogenous levels of TNF-α produced by monocytes from pregnant women with PE in relation to NT and NP groups. The MSU stimulation led to increased TNF-α production by preeclamptic group only when compared to the NT group. It is also observed lower production of TNF-α protein by monocytes from NT group, stimulated or not with MSU, in comparison to NP group. Monocytes from preeclamptic pregnant and non-pregnant women stimulated with MSU showed higher TNF-α production in comparison to the basal levels produced by these cells.

Figure 9. TNF-α production by monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), stimulated or not with MSU. * $p<0.05$ vs. NT and NP; # $p<0.05$ vs. NP; ■ $p<0.05$ vs. NT; † $p<0.05$ vs. PE MSU+; @ $p<0.05$ vs. NP MSU+.

Discussion

In pregnant women with PE elevated serum levels of uric acid associated with increased production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1β and TNF-α by mononuclear cells from peripheral blood [16], suggest participation of hyperuricemia in the pathogenesis of PE. It is known that uric acid crystals (MSU) act as DAMPs

activating the complex NLRP3 inflammasome [40]. The results of the present study show higher gene expression of NLRP1 and NLRP3 receptors, caspase-1 as well as IL-1β, IL-18 and TNF-α in peripheral blood monocytes of pregnant women with PE. These results suggest the endogenous activation of these cells, associated with increased production of inflammatory cytokines compared with monocytes from normotensive pregnant women.

It was observed that the gene expression of NLRP1, NLRP3 and caspase-1 have similar profiles to each other and higher expression in monocytes from preeclamptic women compared with normotensive pregnant women and non-pregnant women groups. A recent study [35], showed that uric acid activates the inflammasome in trophoblast cells, leading to IL-1β secretion and, suggesting that it is a novel mechanism for induction of inflammation in the maternal-fetal interface and causing adverse pregnancy outcomes, including preeclampsia.

According to Martinon et al. [21], monosodium urate triggers the increase in gene expression of NLRP3 and caspase-1 in lineage of THP1 monocytes. Our results corroborate with these authors, showing that the stimulus with MSU induces increased NLRP3 and caspase-1 expression in monocytes from women with PE and from non-pregnant women, while the NLRP1 gene showed only a tendency to increased expression in monocytes of pregnant women with PE without statistical significance. Caspases are important cysteinyl aspartate proteases in apoptosis and inflammation mechanisms [41]. Caspase-1 is an important inflammatory protein synthesized as pro-caspase-1, and becomes biologically activated when inflammasome starts its generation process [42], [43]. It is recognized in the literature that NLRP1, NLRP3, AIM2 and IPAF inflammasomes are responsible for caspase-1 activation process, leading to the processing and release of IL-1β and IL-18 [44].

The gene expression of NLRP1 and NLRP3 receptors, caspase-1, IL-1β, IL-18 and TNF-α, as well as the production of these cytokines was higher in monocytes from pregnant women with PE stimulated with MSU compared with normotensive pregnant women. However, when compared to monocytes from healthy women, this increase is significant only in transcriptional, but not in protein level. This difference between gene expression and production of cytokines could be related to the fact that multiple ribosomes can translate a single mRNA molecule at the same time. Ribosomes groups called polysome, allow the simultaneous production of multiple

strings of amino acids (polypeptides). These polypeptides may be complete or require further processing to become mature and to acquire a three-dimensional conformation [45].

The production of IL-1β, IL-18 and TNF-α by monocytes from non-pregnant women stimulated with MSU was increased, reaching a maximum level of production, similar to that observed in pregnant women with PE. These results confirm the ability of uric acid in exerting stimulatory effect on inflammatory activity of these cells by inflammasome activation represented by high expression of the genes encoding the NLRP3 receptor and caspase-1 protein, as well as increase in the inflammatory cytokines IL-1β and IL-18 production after cell stimulation in NP group.

In preeclamptic women there was no significant increase in gene expression and production of IL-1β after monocyte stimulation with MSU as showed in Figure 2. This phenomenon may be occurred probably because the cells were already significantly activated in PE, and producing higher endogenous levels of this cytokine. Siljee and colaborators [46] suggest that increased serum levels of IL-1β during the first trimester of pregnancy, in the absence of other inflammatory proteins, can be considered an early biomarker of onset of PE and an important pathogenic factor for the development of this disease.

Monocytes from normotensive pregnant women stimulated with MSU, in turn, have lower gene and protein expression of inflammatory cytokines IL-1β, IL-18 and TNF-α in relation to PE and NP groups. The lowest gene expression of these cytokines by monocytes from NT group could be due to the regulatory activity of IL-10 on these cells. The predominance of higher levels of this anti-inflammatory cytokine predominance in normal pregnancy acts to minimize the deleterious effects of excessive inflammatory response, being able to regulate the inflammatory response that occurs during pregnancy by controlling the IL-1β and TNF-α gene expression [47]. It is known that IL-10 exerts a potent inhibitory effect on the production of inflammatory cytokines such as IL-1β and TNF-α by activated monocytes [48]. However, in PE, this regulation does not occur adequately, and the balance is altered, with decreased IL-10 and increased TNF-α [49]. In previous work, it was shown that monocytes from preeclamptic pregnant women produce endogenous IL-10 significantly lower than in normotensive pregnant women, while TNF-α values are high [13], confirming the findings in the literature [12], [50].

In the present study no significant differences were detected between preeclamptic and NP groups in relation to endogenous IL-18 gene expression and cytokine production. However, monocytes from these both groups produced higher levels of IL-18 after MSU stimulation (Figures 2B and 4B). Pro-IL-18 is constitutively present in healthy people monocytes [51]. Then, it was expected that the increase in gene and protein expression was not as obvious as that of other inflammatory cytokines. IL-18 is also secreted by inflammasome activation [52], [53]. We also observed that there was more intense production of IL-1β than IL-18, demonstrated by high levels of IL-1β secreted by monocytes from the three groups. It is believed that this occurred because IL-18 also stimulates the secretion of Th2 cytokines with anti-inflammatory activity [54]. Thus, IL-18 induces Th1 and Th2 responses, acting as a cytokine with both inflammatory and anti-inflammatory profiles.

The production of proinflammatory cytokines is a critical step for an effective innate immune response and is also a mechanism by which this response influences the subsequent development of adaptive immune response [55]. IL-1β and IL-18 are examples of key cytokines which not only activates monocytes, macrophages and neutrophils but also specifically direct the development of the adaptive immune response of CD4+ T cells in humans and mice. The differentiation of CD4+ T cells in the presence of IL-1β and IL-18 results in Th17 and Th1 effector cells, respectively [56], [57]. The predominant profile of Th17 cells on regulatory T cells in pregnant women with PE could act by modulating the Th1/Th2 balance [58], suggesting that both innate and adaptive immunity are involved in the excessive inflammatory response that occurs in this obstetric pathology [59].

The endogenous and MSU-induced gene expression of TNF-α, was higher in monocytes from pregnant women with PE compared to NT and NP groups, while the cytokine production was significantly higher in PE group than in the NT group. This increased TNF-α production by monocytes from preeclamptic pregnant women confirms previous results from the literature [60], [11], [13], demonstrating that elevated serum uric acid levels correlate with increased production of TNF-α and free radicals released by monocytes from pregnant women with PE compared to normotensive pregnant women [14]. These elevated levels of TNF-α in peripheral blood of preeclamptic pregnant woman might activate NLRP1 and NLRP3 inflammasomes in monocytes by its stimulatory effect on the nuclear factor-κB

transcription. The synthesis of TNF-α and IL-1β is controlled, in part, by NF-κB, which is more active in pregnant women with PE cells [16]. NF-κB regulates the transcription of genes related to inflammation [61], [62] and TNF-α, in turn, acts stimulating NF-κB activation, and maintaining a cell cycle activation [63]. Thus, although not directly related to the inflammasome, TNF-α is an important inflammatory cytokine produced in the first activation signal of this multiprotein complex.

Activation of inflammasomes requires two signals. The first signal is the activation of the TLR receptor, a fact that causes the production of pro-IL-1β and pro-IL-18, as well as hyper-regulation of transcription and translation of NLRP3 molecules. Additionally, signals provided by NF-kB activation are necessary but not sufficient for NLRP3 activation, and a second stimulus, such as damage induced by crystals, is required for NLRP3 activation [64]. The second signal is related to the assembly and the inflammasome activation and can be activated by a variety of stimuli [65], including MSU. According to Bauernfeind and colaborators [64], the need for this double stimulation to activate the inflammasome could be important for preventing uncontrolled activation of NLRP3, responsible for devastating consequences in the host, as in autoinflammatory diseases.

In conclusion, the present results show, for the first time, that monocytes from preeclamptic women have endogenous activation of the inflammasomes NLRP1 and NLRP3 and secrete higher levels of IL-1β, IL-18 and TNF-α. Stimulation of these cells with MSU, induces increase in gene expression of NLRP3 receptor and caspase-1, as weel as IL-18 production, that is more evident in preeclamptic pregnant and non-pregnant women groups. These results demonstrate the role of uric acid in NLRP3 inflammasome activation and release of inflammatory cytokines, suggesting the envolvement of this inflammatory complex in the pathogenesis of preeclampsia.

References

1. Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. Reproduction. 2010; 140:803-313.

2. 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.
3. De Oliveira LG, Karumanchi A, Sass N. Preeclampsia: oxidative stress, inflammtion and endothelial dysfunction. Rev Bras Ginecol Obst. 2010; 32:609-616.
4. Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. Semin Reprod Endocrinol. 1998; 16:5-15.
5. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. Semin Fetal Neonatal Med. 2006; 11:309-316.
6. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Science 205; 308:1592-1594.
7. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1999; 180:499-506.
8. 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; 109:836-839.
9. Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. Placenta. 2003; 24:S21-S27.
10. Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. Clin Immunol. 2006; 118:268-275.
11. Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2007; 57:177-185.
12. Orange S, Horvath J, Hennessy A. Preeclampsia is associated with a reduced interleukin-10 production from peripheral blood mononuclear cells. Hypertens Pregnancy. 2003; 22:1-8.
13. Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, Peraçoli MT. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. Free Radic Res. 2013; 47: 268-275.
14. Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased Reactive Oxygen Species and Tumor Necrosis Factor-Alpha Production by Monocytes are Associated with Elevated Levels of Uric Acid in Pre-Eclamptic Women. Am J Reprod Immunol. 2011; 66:460-467.
15. 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: 346-359.
16. Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF-κB pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. J Reprod Immunol. 2012; 95: 67-72.
17. Medeiros LT, Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Golim MA, et al. Monocytes from pregnant women with pre-eclampsia are polarized to a M1 phenotype. Am J Reprod Immunol. 2014; 72: 5-13.
18. Martin AC, Brown MA. Could uric acid have a pathogenic role in pre-eclampsia? Nat Rev Nephrol. 2010; 6: 744–748.
19. 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: 129-134.

20. Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. Placenta 2008; 29:S67–S72.
21. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature. 2006; 440:237–241.
22. Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. J Inflamm Res. 2011; 4:39-49.
23. Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, et al. Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? Am J Obstet Gynecol. 2005; 193:921-927.
24. Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstettre A, Agostini A, Capelle M, et al. Preeclampsia: impaired inflammatory response mediated by Toll-like receptors. J Reprod Immunol. 2008; 78: 0-83.
25. Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. Reprod Sci. 2008; 15:231-242.
26. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science. 2002; 296:301-305.
27. Yang CS, Shin DM, Jo EK.The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. Int Neurourol J. 2012; 16:2-12.
28. Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. Trends Immunol. 2005; 26:447-454.
29. Grishman EK, White PC, Savani RC. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1β in the development and progression of type 1 diabetes. Pediatr Res. 2012; 71:626-632.
30. Haneklaus M, O'Neill LA, Coll RC. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. Curr Opin Immunol. 2013; 25:40-5.
31. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP-3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Different. 2007; 14:1583–1589.
32. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. Nat Immunol. 2009; 10:241-247.
33. Conforti-Andreoni C, Spreafico R, Qian HL, Riteau N, Ryffel B, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Uric acid – drivem Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. J Immunol. 2011; 187:5842-5850.
34. Rock KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. Nat Rev Rheumatol. 2013; 9:13-23.
35. Mulla MJ, Myrtolli K, Potter J, Boeras C, Kavathas PB, Sfakianaki AK, et al. Uric acid induces trophoblast IL-1β production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia.Am J Reprod Immunol. 2011; 65:542-548.
36. Pontillo A, Reis EC, Bricher PN, Vianna P, Diniz S, Fernandes KS, et al. NLRP1 L155H Polymorphism is a Risk Factor for Preeclampsia Development. Am J Reprod Immunol. 2014 Dec 29. doi: 10.1111/aji.12353.
37. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968; 97:77-89.

38. Li CY, Lam KW, Yam LT. Esterases in human leukocytes. J Histochem Cytochem. 1973; 21:1-12.
39. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinform. 2005; 6:62.
40. Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, Núñez G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. J Leukoc Biol. 2007; 82(2):220-5.
41. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Biochem J. 2004; 384(Pt 2):201-232.
42. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflamation, and associated diseases. Annu Rev Immunol. 2011; 29:707-735.
43. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. Nature. 2012; 481(7381):278-86.
44. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. Cell; 2010; 140(6):821-32.
45. The information in DNA determines cellular function via translation. Scitable-Nature Education. Avaiable: http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-information-in-dna-determines-cellular-function-6523228.
46. Siljee JE, Wortelboer EJ, Koster MP, Imholz S, Rodenburg W, Visser JH, de Vries A, Schielen PC, Pennings JL. Identification of interleukin-1 beta, but no other inflammatory proteins, as an early onset pre-eclampsia biomarker in first trimester serum by bead-based multiplexed immunoassays. Prenat Diagn. 2013; 33(12):1183-8.
47. Cheng SB, Sharma S. Interleukin-10: A pleiotropic regulator in pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2014; Oct 1. doi: 10.1111/aji.12329.
48. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol. 2001; 19:683-765.
49. Marzi M; Vigano A; Trabattoni D; Villa ML; Salvaggio A, Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. Clin Exp Immunol. 1996; 106(1):127-33.
50. Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2005; 54(1):30-7.
51. Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. Semin Immunol. 2013; 25(6):439-48.
52. Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. J Infect Dis. 2003; 187 Suppl 2:S370-84.
53. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol. 2009; 27:519-50.
54. Klimkiewicz-Blok D, Florjański J, Zalewski J, Blok R. Analysis of the concentrations of interleukin 18 in amniotic fluid in the second and the third trimesters of pregnancy. Adv Clin Exp Med. 2013; 22(5):699-703.
55. Ciraci C, Janczy JR, Sutterwala FS, Cassel SL. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. Microbes Infect. 2012; 14(14):1263-70.
56. Dinarello CA. IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. J. Allergy Clin Immunol. 1999, 3(1Pt 1):11-24.
57. Lasiglie D, Traggiai S, Federici M, Alessio M, Buoncompagni A, Accogli A, Chiesa S, Penco F, Martini A, Gattorno M. Role of IL-1beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients. Plos One. 2011; 6:e20014.

58. Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzelak B, Oleszczuk J. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. J Reprod Immunol. 2012; 93(2):75-81.
59. Toldi G, Rigó J Jr, Stenczer B, Vásárhelyi B, Molvarec A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2011; 66(3):223-9.
60. Beckmann I, Efraim SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women.Hypertens Pregnancy. 2004; 23(3):319-29.
61. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90(21):10193-7.
62. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Liu XD, Brabcova I, Sekerkova A, Poole JA, Jaresova M, Slavcev A, Rennard SI. Epithelial cells modulate genes associated with NF kappa B activation in co-cultured human macrophages. Immunobiology. 2011; 216(10):1110-6.
63. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. Annu Rev Immunol. 2009; 27:693-733.
64. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappa B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J Immunol. 2009; 183(2):787-91.
65. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. Annu Rev Immunol. 2009; 27:229-65.

Acknowledgements

The authors thank the staff of the hospitals and the women who participated in this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MTP JCP MR MLM

Performed the experiments: MLM MR ICW VRR PRN JPAJr

Analyzed the data: MLM MR MTP

Contributed reagents/ materials/ analysis tools: MLM MR MTP VRR PRN JPAJr

Selected pregnant women: JCP VTMB LGO

Wrote the paper: MLM MR MTP JCP

Figure 1

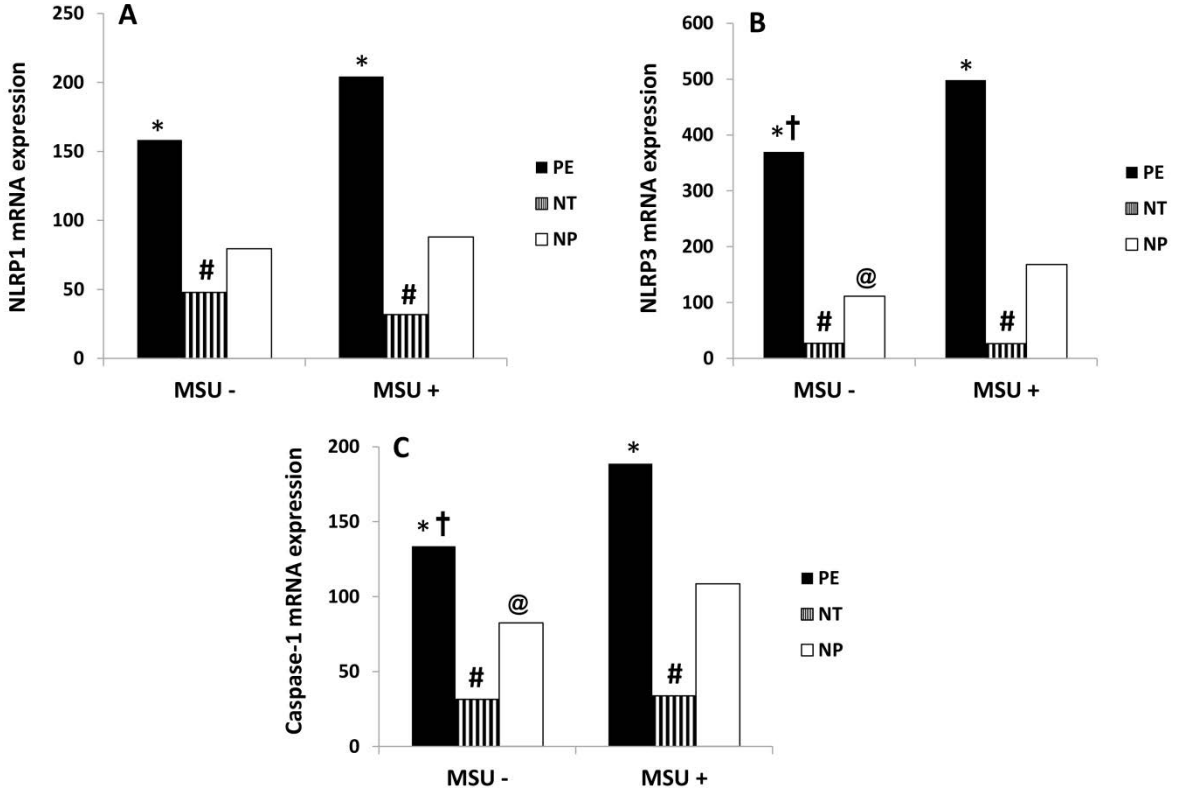


Figure 2

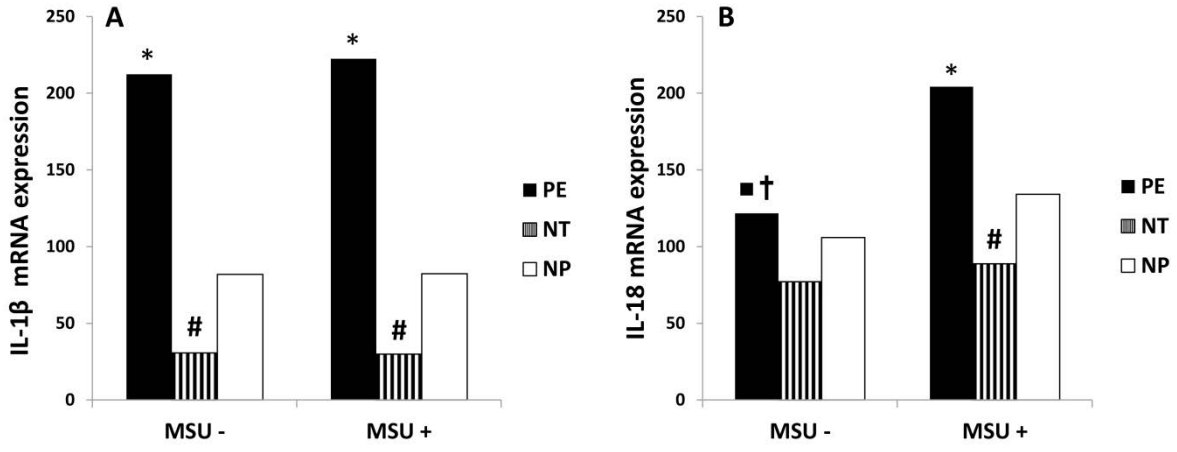


Figure 3

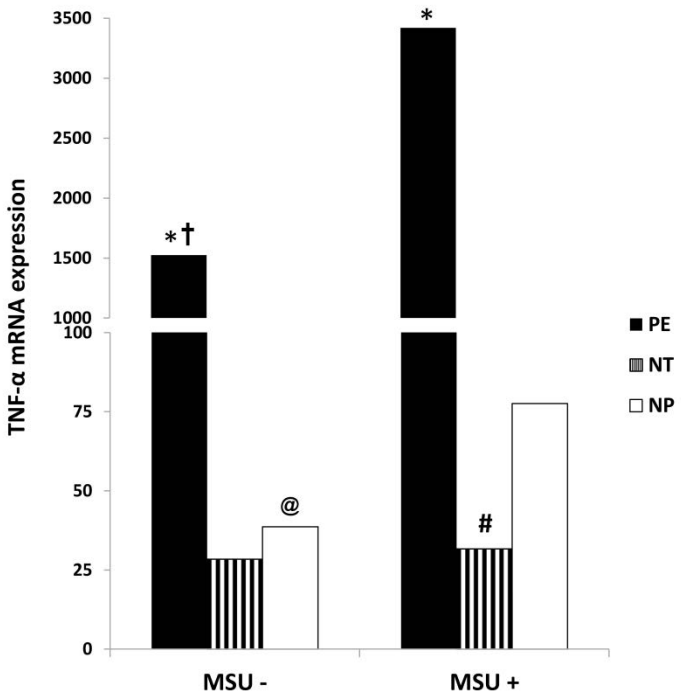


Figure 4

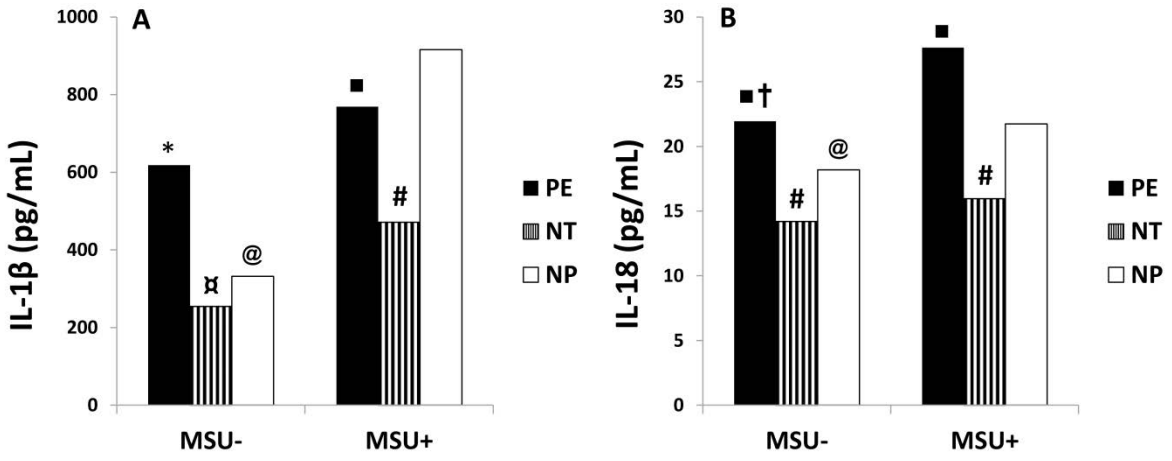
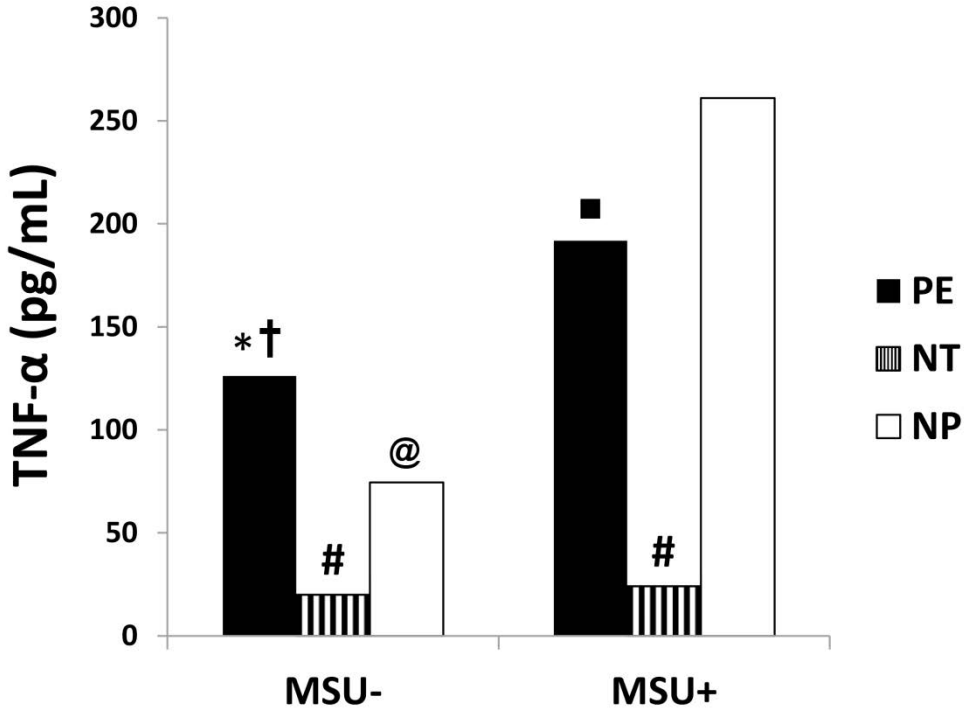


Figure 5



Capítulo III

Este capítulo foi redigido como artigo original o qual será submetido para publicação.

Association between pro-inflammatory cytokines and autophagy induction by sera from women with preeclampsia

Mariana Leticia Matias[1], Maria T. Peraçoli[2], Tomi T. Kanninen[3], Giovanni Sisti[3], Mariana Romao[2], Ingrid C. Weel[2], José C. Peraçoli[1], Ann Marie Bongiovanni[3], Steven S. Witkin[3]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, Botucatu Medical School, UNESP- Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil;

[2]Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, UNESP- Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil;

[3]Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Immunology and Infectious Diseases, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

ABSTRACT

Introduction: Preeclampsia (PE) is a clinical complication of pregnancy associated with elevated serum levels of inflammatory cytokines, leukocyte activation and oxidative stress. Autophagy, an intracellular catabolic process, which removes damaged organelles and cytoplasmic proteins seems to be able of cellular homeostasis maintenance, but also has a potent anti-inflammatory mechanism, which controls the activation of inflammasomes, a cell structure responsible by production of the inflammatory cytokines Interleukin-1 beta (IL-1β) and IL-18.

Objectives: The present study compared the ability of sera from pregnant women with or without preeclampsia to induce autophagy in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and the relation between this activity and serum concentrations of uric acid, IL-1β, IL-10 and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α).

Methods: PBMC from 20 healthy non-pregnant women were incubated with sera from 45 pregnant women, being 23 normotensive and 22 with PE in the presence or absence of the autophagy inducer, rapamycin. After 48 h the cells were assayed for p62, a cytoplasmic protein associated with autophagy inhibition, and sera from both groups of pregnant women were tested for IL-1β, IL-10 and TNF-α by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Autophagy was induced to a greater extent by sera from women with preeclampsia than by sera of normotensive pregnant women. The relationship between the serum inflammatory cytokines in sera of preeclamptic pregnant women showed association between autophagy induction (decrease in cytoplasmic p62) and higher concentrations of IL-1β ($r = - 0.4949$; $p = 0.0192$), and TNF-α ($r = - 0.5302$; $p = 0.0111$). This relationship was absent in sera from normotensive women. There was no association between IL-10 or uric acid levels and autophagy both in preeclamptic and normotensive group.

Conclusion: Association between autophagy induction and higher levels of inflammatory cytokines in sera from patients with preeclampsia suggests that the enhanced pro-inflammatory state characteristic of preeclampsia may result in the up-regulation of autophagy induction in these women.

Key words: preeclampsia, autophagy, p62, IL-1β, TNF-α

INTRODUCTION

Preeclampsia (PE) is a specific syndrome of human pregnancy affecting between 5% and 7% of primigravid women (Sibai et al., 2005; Unal et al., 2007), and is characterized by new-onset hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation (Walker, 2000; ACOG, 2002). The disease is classified into mild and severe, according to clinical and laboratory manifestations presented by pregnant women (ACOG, 2002).

Association between elevated levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines in serum as well as enhanced leukocyte activation and oxidative stress in PE have been reported (Lok et al., 2009; De Oliveira et al., 2011; Peraçoli et al., 2011, Giorgi et al., 2012). This systemic inflammatory reaction is similar to that observed in normal pregnancy, but shows greater intensity (Redman & Sargent, 2003; 2005). Therefore, an exacerbated maternal inflammatory response that includes activation of inflammatory cells such as monocytes and granulocytes, as well as endothelial cells may contribute to development of PE (Oian et al., 1985; Borzychowski et al., 2006).

Hyperuricemia has been observed in women with PE associated with the severity of disease (Martin & Brown, 2010). High levels of uric acid in the plasma of patients with PE are interpreted not only as a marker of severity (Martin & Brown, 2010), but represent a direct contribution to the pathogenesis of PE by its potential to promote inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction (Bainbridge & Roberts, 2008). A positive correlation between the increased production of the inflammatory cytokine TNF-α and superoxide anion by peripheral blood monocytes and elevated serum uric acid levels in PE has been described and suggests that these cells may be the major source of TNF-α in patients' serum (Peracoli et al., 2007; 2011; Cristofalo et al., 2013).

The excessive activation of intravascular monocytes/macrophages and granulocytes in PE, suggest that innate immune system activation negatively influences pregnancy progression. However, the significance of these immunological changes for the pathophysiology of PE remains unknown. Analysis of the activation state of peripheral blood mononuclear cells from normotensive and preeclamptic pregnant women showed an association between increased expression of nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) and higher production of TNF-α and IL-1β by

these cells (Giorgi et al., 2012). Higher levels of IL-1β in PE can also be related to the hyperuricemia found in these patients. Uric acid crystals as well as other danger signals generated by pathogens and cell stress can activate an intracellular complex called the inflammasome, a multi-protein structure essential for processing and release of bioactive IL-1β and IL-18 (Martinon et al., 2006; Gross et al., 2011). Trophoblast cells incubated with monosodium urate secreted IL-1β via Nalp3 inflammasome activation, suggesting that this mechanism may led to placental dysfunction and adverse pregnancy outcome, including preeclampsia (Mulla et al., 2011).

Autophagy is an intracellular catabolic process present in all eukaryotic cells that maintains homeostasis by the removal of damaged organelles and proteins from the cytoplasm. The material to be removed becomes enclosed in a double-membrane structure called the autophagosome. This fuses with a lysosome and the internalized material is degraded. The components are then returned to the cytoplasm to provide substrates for anabolic pathways and energy production. (Mizushima, 2009; Lippai & Low, 2014). Inflammatory signals activate autophagy that in turn, limits IL-1β production by inflammasome destruction. Then, autophagy reduces the inflammation while its blockage has an opposite effect (Shi et al., 2012). Therefore, autophagy is a potent anti-inflammatory mechanism, which controls the activation of inflammasome (Ravikumar et al., 2010). p62 is a cytoplasmic protein that is consumed during autophagy induction and its measurement is commonly used to assess the extent of autophagy induction (Lippai & Low, 2014). Since p62 is removed from the cytoplasm by autophagy, this protein concentration in cell is generally considered to inversely correlate with autophagic activity (Klionsky et al., 2012). The role of autophagy in preeclampsia has been scarcely studied. Autophagy is induced in the placenta during gestation, and elevated autophagic activity at this site has been associated with the development of severe preeclampsia (Oh et al., 2008). Recently, Kanninen et al. (2013) demonstrated that sera from pregnant women inhibited autophagy induction in peripheral blood mononuclear cells as compared to sera from non-pregnant controls. The present study sought to compare the ability of sera from pregnant women with or without preeclampsia to induce autophagy in mononuclear lymphoid cells obtained from healthy non-pregnant

women and to evaluate whether serum levels of uric acid, IL-1β, IL-10 and TNF-α may influence the extent of autophagy induction.

MATERIAL AND METHODS

The study employed serum obtained from 45 pregnant women without a previous history of hypertension or obstetric and medical complications, admitted to the Obstetric Unit of Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil. Twenty two women were diagnosed with preeclampsia (PE), defined as a persistent elevated blood pressure value of 140x90 mmHg and proteinuria (≥ 300 mg in urine collected during 24 hours) after the 20^{th} week of gestation (NHBPEP, 2000). A group of 23 pregnant women with an uncomplicated pregnancy that remained normotensive and nonproteinuric throughout pregnancy was recruited as controls and matched for gestational age with the preeclamptic group. Gestational age was calculated from the last menstrual period and confirmed by ultrasound dating. Proteinuria in 24-hour urine was measured by a colorimetric method, the Technicon RAXT automation system, and uric acid was assessed by uric acid enzymatic Trinder (Biotrol Diagnostic) in the Clinical Laboratory, Clinical Hospital of Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil. Exclusion criteria included multiple gestation, prior PE, pregnant women in labor, illicit drug use, and pre-existing medical conditions such as chronic hypertension, diabetes, infectious and renal diseases. Written informed consent was obtained from all women involved in the study, and the study was approved by the Ethics Committee of the Botucatu Medical School.

Peripheral blood from 20 healthy female volunteers of reproductive age with the same age range of pregnant women was collected in heparinized tubes and utilized for isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, New Jersey). The mononuclear cell band was retrieved, the cells washed twice in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 culture medium (Invitrogen, Carlsbad, California) and resuspended in RPMI to a final viable concentration of 5×10^6 cells/mL. The PBMCs were added to wells of a sterile microtiter plate (5×10^5 cells per well) that contained 35 µL RPMI and 15 µL serum from normotensive or preeclampptic pregnant women. Following incubation for 48 h in a 37^oC, 5% CO_2

incubator, the cultures were centrifuged for 5 min and the pellet cell fraction was immediately evaluated for autophagy, as described below. To determine the maximum level of autophagy induced in PBMCs, parallel cultures were incubated with 800 mmol/L rapamycin, a potent pharmacological autophagy inducer (Massey et al., 2008).

Cell pellets were suspended in 140 µL of a cell lysate buffer (1% Triton X 100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 20 µg/mL deoxyribonuclease, 100 mmol/L protease inhibito cocktail (Sigma) in 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, and 1 mmol/L ethylene glycol tetraacetic acid), incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 11000 rpm for 10 min. The supernatant was immediately tested for p62 by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York).

Cytokine concentration in sera from preeclamptic and normotensive pregnant women were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for IL-1β, IL-10 and TNF-α according to the manufacturer,s instructions. Assay sensitivity limits were 1.6 pg/mL for TNF-α, 1 pg/mL for IL-1β and 3.0 pg/mL for IL-10.

Statistical analysis of age, gestational age, blood pressure as well as proteinuria, uric acid and p62 levels were performed employing nonparametric tests. Association between concentrations of p62 and IL-1β, IL-10, TNF-α and uric acid levels were evaluated by the Spearman rank correlation test. $p<0.05$ was considered significant. GRAPH PAD INSTAT (Graft Pad Software, San Diego, California) was used for the analysis.

RESULTS

Clinical characteristics of preeclamptic and normotensive pregnant women are shown in Table 1. There were no significant differences in maternal age and gestational age between groups. Systolic and diastolic blood pressure as well as proteinuria and uric acid concentrations were significantly higher in women with preeclampsia than in normotensive pregnant women.

Table 2 shows the concentrations of IL-1β, TNF-α and IL-10 detected in the sera of these normotensive and preeclamptic pregnant women. IL-1β and TNF-α

levels were significantly higher while IL-10 levels were significantly lower in sera of women with preeclampsia compared to normotensive pregnant women.

The effect of sera obtained from both groups on autophagy induction in PBMCs is shown in Figure 1. Median values of p62 in PBMC cultured without rapamycin and treated with sera from normotensive pregnant women (8.26 pg/mL) range (4.21 – 19.78) were significantly higher ($p<0.01$) than those detected in cultures treated with preclamptic sera (3.91 pg/mL) range (1.03 – 12.62). Inclusion of rapamycin, a pharmacological inducer of autophagy, resulted in production of significant higher levels of autophagy, detected by lower levels of p62 in cultures of PBMCs treated with sera from normotensive pregnant group (4.15 pg/mL) range (0.14 – 10.03). No significant differences were observed in cultures with or without rapamycin using sera from preeclamptic women. These results suggest that autophagy was induced to a greater extent by sera from women with preeclampsia than by normotensive pregnant women.

The correlation analysis between cytokine concentrations in sera of preeeclamptic and normotensive pregnant women, and p62 levels in PBMC cultures showed an association between the extent of autophagy induction (decrease in cytoplasmic p62) and concentrations of IL-1β ($r = - 0.4949$; $p = 0.0192$), and TNF-α ($r = - 0.5302$; $p = 0.0111$) only in sera from the preeclamptic women. This relationship was absent in sera from normotensive women. There was no association between IL-10 or uric acid levels and autophagy induction in the both preeclamptic and normotensive groups.

Table 1. Characteristics of Normotensive (NT) Pregnant and Preeclamptic (PE) women.

Variable	Groups		*p*- value *
	PE (n = 22)	NT (n = 23)	
Age (years)	22.5 (16 – 43)	23 (15 –29)	NS
Gestational age (weeks)	33 (27 – 39)	32 (23 – 39)	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	160 (140 – 210)	110 (103-112)	<0.05
Diastolic blood pressure (mmHg)	110 (93 – 140)	69 (63-70)	<0.05
Proteinuria (g/24h)	2.44 (0.32 – 26.4)	< 0.3	<0.01
Uric acid (mg/dL)	7.2 (4.6 – 11.5)	3.8 (2.2 – 4.6)	< 0.01

* Mann-Whitney *U* test
NS= Not Significant

Table 2. Cytokines concentration in serum of normotensive and preeclamptic pregnant women.

Cytokines (pg/mL)	Normotensive (n = 23)	Preeclamptic (n = 22)	p *
IL-1β	4.16 (3.37 – 6.61)	16.45 (7.8 – 33.27)	< 0.001
TNF-α	7.80 (5.1 – 11,0)	17.04 (7.7 – 52.3)	< 0.001
IL-10	41.8 (22.16 – 95.71)	11.9 (5.12 – 33.7)	< 0.001

*Mann-Whitney *U* test

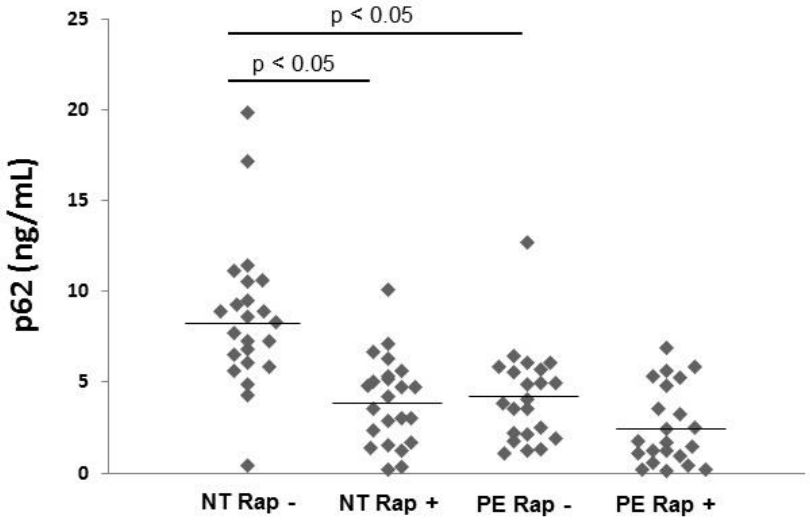


Figure 1. Influence of sera from normotensive (NT) and preeclamptic (PE) pregnant women on autophagy induction in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMCs from non-pregnant women were incubated in sera from both groups of pregnant women for 48 h in the presence (Rap +) or absence (Rap -) of rapamycin. The cells were harvested and lysed, and intracellular concentrations of p62 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Horizontal bars represent median values. Kruskal-Wallis test.

DISCUSSION

The present study evaluated the effect of sera from normotensive and preeclamptic pregnant women on autophagy induction in PBMCs obtained from healthy non-pregnant women. After 48 hour incubation the intracellular p62 concentration was significantly lower in PBMC cultures incubated with sera from preeclamptic women than when incubated with sera from normotensive controls. p62 is a compound that is consumed during autophagy induction, so that the higher the concentration of p62 detected in cytoplasm the lower is the level of autophagy induction (Klionsky et al., 2012). Then, cytoplasmic p62 level may be used as autophagy indicator (Lippai & Low, 2014). The findings, therefore, indicate that sera from preeclamptic women are better autophagy inducers. In parallel experiments addition of the autophagy inducer, rapamycin, led to autophagy to a greater extent in PBMCs incubated with sera from normotensive women than in the absence of rapamycin (p62 levels were lower). In marked contrast, inclusion of rapamycin had no effect on the extent of autophagy induction by sera from women with preeclampsia demonstrated by no significant change in p62 level. These

observations indicate that sera from women with preeclampsia, but not sera from normotensive controls, had already induced autophagy to the maximum extent possible, with no further induction in the presence of rapamycin. These results suggest that sera from women with preeclampsia contained factors that play a role in autophagy induction.

The evaluation of cytokine concentrations in subjects' sera demonstrated higher levels of IL-1β and TNF-α, as well as lower levels of IL-10 in the preeclamptic group compared with normotensive pregnant women. An elevated pro-inflammatory immune response is a characteristic of women with preeclampsia (Redman & Sargent, 2003; Borzychowski et al., 2006; Giorgi et al., 2012). In previous studies we demonstrated higher levels of TNF-α in plasma of patients with preeclampsia (Peraçoli et al., 2007; 2013). Moreover, peripheral blood mononuclear cells obtained from these patients produce significant higher endogenous concentrations of TNF-α and IL-1β, as well as increased NF-κB activation than normotensive pregnant women (Giorgi et al., 2012) associated with lower levels of IL-10 (Cristofalo et al., 2013).

The extent of autophagy induction by sera from women with preeclampsia, but not by sera obtained from normotensive pregnant women, was proportional to the serum concentrations of IL-1β and TNF-α (inversely proportional to the p62 concentration). These findings are consistent with previous studies that demonstrated IL-1β and TNF-α induced autophagy in macrophages and PBMCs (Harris, 2011; 2013). TNF-α can induce or inhibit autophagy in an NF-κB dependent way, and may be involved in autophagy and inflammasome interplay. In the presence of NF-κB activation, this cytokine activates mTOR, a major autophagy inhibitor. In contrast, in cells lacking NF-kB activation, TNF-α treatment up-regulates the expression of autophagy-promoting Beclin 1, inducing the accumulation of autophagic vacuoles in sarcoma cells (Djavaheri-Mergny et al., 2006). The pro-inflammatory state detected in sera of patients with preeclampsia, showing higher levels of TNF-α and IL-1β could play a role in up-regulation of autophagy in PBMC from healthy women, detected in the present study. On the other hand, autophagy can regulate the transcription, processing and secretion of IL-1β, as well as the secretion of IL-1β and IL-18, products of inflammasome generation (Shi et al., 2012; Harris 2013). Thus, autophagy may represent an important mechanism in a negative feedback loop to control the secretion of inflammatory cytokines (Harris, 2013).

Autophagosome formation in the context of inflammasome induction was functionally important, as either diminishing p62 expression or autophagy blockade enhanced IL-1β production (Shi et al., 2012).

Other danger signals such as heat shock protein 70 (Hsp70) and hyaluronan present in higher levels in sera from preeclamptic patients (Peraçoli et al., 2013; Romão et al., 2014) might play a role in PBMC inflammasome activation, which in turn lead to autophagosome formation. Then, autophagy as a potent anti-inflammatory mechanism might control the activation of danger sensors, i.e. Nalp3 inflammasome (Ravikumar et al., 2010; Salminen et al., 2012). This mechanism deserves future investigations.

No significant correlation was observed between high levels of uric acid in sera of preeclamptic patients and autophagy induction. However, uric acid might acts as a mediator of inflammation by its ability to activate Nalp3 inflammasome, essential for processing and release bioactive IL-1β and IL-18 (Martinon et al., 2006; Mulla et al., 2011). Thus, as a IL-1β inducer, uric acid may be indirectly involved in autophagy induction.

In conclusion our results showed that there is an association between autophagy induction and higher levels of inflammatory cytokines in sera from patients with preeclampsia. Further studies on relationship between autophagy and inflammasomes might improve our understanding of the pathophysiology of preeclampsia.

References

American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin no. 33. Washington, DC.: ACOG. 2002; (2):229–35.

Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. Placenta. 2008; 29:S67–S72.

Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. Semin Fetal Neonatal Med. 2006; 11(5):309-16.

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(4):268-75.

De Oliveira LG, Saraiva NO, Peraçoli JC, Peraçoli MT, Moron AF, Sass N: sFlt-1 and IP-10 in women with early-onset preeclampsia. Pregnancy Hypert: Int J Women's Cardiovasc Health. 2011; 1:129-131.

Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besançon F, Bauvy C, Souquère S, Pierron G, Codogno P. NF-kappaB activation repress tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. J Biol Chem. 2006; 281(41):30373-82.

Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF-κb pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. J Reprod Immunol. 2012; 95:67-72.

Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. Immunol Rev. 2011; 243(1):136-51.

Harris J. Autophagy and IL-1 family cytokines. Front Immunol. 2013; 4:83.

Harris J. Autophagy and cytokines. Cytokine. 2011; 56(2):140-44.

Kanninen TT, de Andrade Ramos BR, Jaffe S, Bongiovanni AM, Linhares IM, Renzo GC, Witkin SS. Inhibition of autophagy by sera from pregnant women. Reprod Sci. 2013; 20(11):1327-31.

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy. 2012; 8(4):445-544.

Lippai M, Lőw P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. Biomed Res Int. 2014; 2014:832704.

Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A, Van der post JA. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 2009; 61(5):346-59.

Martin AC, Brown MA. Could uric acid have a pathogenic role in pre-eclampsia? Nat Rev Nephrol. 2010; 6(12):744–8.

Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature. 2006; 440(7081):237–41.

Massey DC, Bredin F, Parkes M. Use of sirolimus (rapamycin) to treat refractory Crohn's disease. Gut. 2008; 57(9):1294-6.

Mizushima N. Physiological functions of autophagy. Curr Top Microbiol Immunol. 2009; 335:71-84.

Mulla MJ, Myrtolli K, Potter J, Boeras C, Kavathas PB, Sfakianaki AK, Tadesse S, Norwitz ER, Guller S, Abrahams VM. Uric acid induces trophoblast IL-1β production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 2011; 65(6):542-8.

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(1):S1-S22.

Oh SY, Choi SJ, Kim KH, Cho EY, Kim JH, Roh CR. Autophagy-related proteins, LC3 and Beclin-1, in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. Reprod Sci. 2008; 15(9):912-20.

Oian P, Omsjø I, Maltau JM, Osterud B: Increased sensitivity to thromboplastin synthesis in blood monocytes from pre-eclamptic patients. Br J Obstet Gynaecol. 1985; 92(5):511-517.

Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. J Reprod Immunol. 2013; 100(2):129-34.

Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased Reactive Oxygen Species and Tumor Necrosis Factor-Alpha Production by Monocytes are Associated with Elevated Levels of Uric Acid in Pre-Eclamptic Women. Am J Reprod Immunol. 2011; 66(6):460-7.

Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2007; 57(3):177-85.

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2010; 90(4):1383-435.

Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. Placenta. 2003; 24(suppl A):S21-S27.

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Science. 2005; 308(5728):1592-4.

Romão M, Weel IC, Lifshitz SJ, Peraçoli MT, Witkin SS. Elevated hyaluronan and extracellular matrix metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia. Arch Gynecol Obstet. 2014; 289(3):575-9.

Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. Aging (Albany NY). 2012; 4(3):166-75.

Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. Nat Immunol. 2012; 13(3):255-63.

Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. Lancet. 2005; 365(9461):785-99.

Unal ER, Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY: Second-trimester angiogenic factors as biomarkers for future-onset preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2007; 197(2):211.e1-4.

Walker JJ. Pre-eclampsia. Lancet. 2000; 356(9237):1260-5.

Anexos

ANEXO 1 – Parecer do Conselho de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ENVOLVIMENTO DE INFLAMASSOMO E AUTOFAGIA NA FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPSIA

Subprojeto 1: Avaliação de inflamassomo NLRP3 e autofagia em placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Subprojeto 2: Envolvimento do inflamassomo na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Subprojeto 3:Análise do inflamassomo NLRP3 induzido por ácido úrico em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Pesquisador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17748313.2.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 349.847

Data da Relatoria: 05/08/2013

Apresentação do Projeto:

Projeto envolvendo 3 subprojetos que são complementares (1 mestrado e 2 doutorad) ser conduzido pela pesquisadora e colaboradores (Ingrid Cristina Weel, José Carlos Peraçolli, Mariana Letícia Matias, Mariana Romão e Vera Therezinha Borges).

Objetivo da Pesquisa:

Subprojeto 1: a)Avaliar a presença de inflamassomo NLRP3 pela detecção de caspase-1, citocinas produzidas (IL-1ß e IL-18) e expressão de HMGB1 e TNF-a em placenta de gestantes normotensas e portadoras de PE; b)Avaliar a ocorrência de autofagia através da análise da expressão das proteínas LC3, Beclin-1 e mTOR em tecido placentário de gestantes normotensas e portadoras de PE.

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

Subprojeto 2: a) A concentração das DAMPs (Hsp70, HMGB1, Hialuronan e Ácido Úrico) no plasma; b)O estado de ativação, endógena e induzida pelas DAMPs (Hsp70, hialuronan e urato monossódico), em monócitos de gestantes com PE pela identificação da presença de inflamassomo NLRP3 e sua associação com a produção de IL-1b, TNF-a e IL-18 nessas células; c)O envolvimento das subpopulações de células T (Th1, Th2, Treg e Th17) na fisiopatologia da PE, analisando o perfil de citocinas e fatores de transcrição produzidos por essas subpopulações celulares; d) Correlacionar a ativação do inflamassomo com o perfil das subpopulações de células T.

Subprojeto 3: a)Avaliar o estado de ativação, endógena e induzida por urato monossódico, de monócitos em gestantes portadoras de PE pela presença de inflamassomo NLRP1/NLRP3 e sua associação com a produção de IL-1b, TNF-a e IL- 18 por essas células; b)Correlacionar a concentração plasmática de ácido úrico com a ativação do inflamassomo e produção de citocinas inflamatórias por monócitos de gestantes com PE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Subprojeto 1: A coleta da placenta não oferece riscos à gestante, a não ser os riscos relativos ao parto e que não estão relacionados com a pesquisa. Subprojeto 2 e 3: No momento da coleta de sangue pode haver dor da picada de agulha e, raramente, formação de um pequeno hematoma no local.

Benefícios:

Os resultados contribuirão para melhor conhecimento dos mecanismos imunes envolvido na fisiopatologia da PE e poderão, no futuro estabelecer estratégias diferentes de prevenção e tratamento dessa patologia obstétrica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo unicentrico, envolvendo 3 subprojetos (1 Mestrado e 2 Doutorado).

Suprojeto 1: avaliação da placenta de 20 gestantes com PE e 20 normotensas.

Subprojeto2:40 gestantes (20 com PE e 20 normotensas), pareadas por idade gestacional e 20 mulheres saudáveis não grávidas.

Subprojeto 3: 46 gestantes (23 normotensas e 23 PE), pareadas por idade gestacional e 23 mulheres saudáveis não grávidas.

Critério de Inclusão:

Subprojeto 1: Gestantes: Ter gestação única, IG entre 28 e 40 semanas com pré-natal e parto no Serviço de Obstetrícia do HC FMB UNESP.

Subprojeto 2 e 3: Gestantes: Ter gestação única, IG entre 28 e 40 semanas com pré-natal e parto no Serviço de Obstetrícia do HC FMB UNESP.
Mulheres normais, não-grávidas: ter a mesma faixa etária das gestantes e serem doadoras voluntárias do Banco de sangue do Hemocentro da FMB-UNESP, sem diagnóstico de qualquer patologia obstétrica ou clínica.
Critério de Exclusão:
Subprojeto 1, 2 e 3: Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de PE tais como: gestação gemelar, préeclâmpsia anterior, hipertensão crônica, diabetes, doenças renais, má-formação fetal, doenças infecciosas, soropositividade para HIV e uso de
drogas e álcool ou não ter a gestação resolvida na Maternidade do HC FMB-UNESP.
Metodologia de análise dos dados adequada (vide projeto).
Número total de sujeitos: 69 sendo 23 mulheres não grávidas (coleta de sangue); 23 com PE (coleta de sangue e/ou placenta); 23 gestantes normotensas (sangue e/ou placenta).
Orçamento: 366.633.85 (FAPESP).
TCLE: elaborado para as gestantes com e sem pré- eclâmpsia e para as doadoras de sangue do hemocentro, em forma de convite, com explicação sobre a doença e sobre o objetivo da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta os seguintes termos:
- Projetos originais
- TCLE apenas para as gestantes com e sem PE e para as doadoras de sangue do hemocenrtro (TCLE)
- Autorização do superintendente do HC
- Autorizaçào do responsável pelo hemocentro
- Folha de rosto (insituiçào proponente IB)
- Termo de compromisso de cumprimento da resolução 196/96
- Declaração de relatório final e cronograma de execução
- Declaração de autorização do Chefe de depto da Micro/Imuno
- Declaração de autorização do Chefe de depto da GO

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os autores revisaram o número de sujeitos do estudo (23 não grávidas, 23 grávidas com pre-

eclâmpsia e 23 gravidas sem pre-eclâmpsia); redigiram um novo TCLE para grávidas com e sem a doença de forma mais explicativa e acrescentaram um novo TCLE para as doadoras de sangue do hemocentro. Também obtiveram a autorizaçào do responsável pelo hemocentro.
Sendo assim, sugiro aprovaçào do projeto, sem necessidade de envio a CONEP.

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:
Projeto de pesquisa APROVADO em reunião do CEP de 05/08/2013, sem necessidade de envio à CONEP.

BOTUCATU, 05 de Agosto de 2013

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(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

ANEXO 2 – Protocolo de Alteração do Título

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA*

Objetivo Acadêmico: Dissertação de Mestrado

Título constante no parecer inicial de aprovação:
Análise do inflamassomo NLRP3 induzido por ácido úrico em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Titulo final:
Análise de inflamassoma induzido por urato monossódico em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 05/08/2013

Declaramos que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

Maria Terezinha Serrão Peraçoli - Orientadora

Mariana Leticia Matias - Orientada

*** Projetos submetidos via Plataforma Brasil: preencher o formulário, digitalizar e postar no sistema plataforma brasil (vide instruções contidas no Of. 06/2014-CEP);**
***Projetos submetidos anteriormente a Plataforma Brasil: preencher o formulário em duas vias e protocolar no CEP que emitiu o Parecer inicial de aprovação**

14116 13/01/2015 0000000 COMITE DE ETICA EM PESQUISA FMB - UNESP

Sub-projeto III

ANEXO 3 – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

"ENVOLVIMENTO DE INFLAMASSOMO E AUTOFAGIA NA FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPSIA"

Projeto 1: Avaliação de inflamassomo NLRP3 e autofagia em placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Projeto 2: Envolvimento do inflamassomo na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Projeto 3: Analise do inflamassomo NLRP3 induzido por ácido úrico em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Eu, _____, gestante, atendida no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, fui convidada a participar da pesquisa para compor a lista de pacientes 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 e/ou será colhido um pedaço da placenta depois do parto. 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

José Carlos Peraçoli – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP
Fone: (14) 3880-1015

Ingrid Cristina Weel – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP
Fone: (14)3880-0431

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

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

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

"ENVOLVIMENTO DE INFLAMASSOMO E AUTOFAGIA NA FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPSIA"

Projeto 1: Avaliação de inflamassomo NLRP3 e autofagia em placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Projeto 2: Envolvimento do inflamassomo na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Projeto 3: Analise do inflamassomo NLRP3 induzido por ácido úrico em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Eu, _____, gestante, atendida na Unidade de Saúde da Família – Jardim Iolanda, 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 e/ou será colhido um pedaço da placenta depois do parto. O convite para participar da pesquisa será feito na ausência de dor ou de qualquer sintoma que dificulte meu entendimento. Estou ciente de que a doação desse volume de sangue não me causará dor, a não ser a da picada da agulha no momento da coleta do sangue e, raramente, a formação de um pequeno hematoma no local. Fui informada que não terei benefícios direto com a pesquisa, mas que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo. Fui informada também que eu posso, a qualquer momento, esclarecer dúvidas e desistir de participar da pesquisa, sem prejuízo do atendimento médico que necessitar e, que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados. Estou ciente de que, caso eu seja menor de idade, este termo de consentimento deverá ser assinado por mim e pelo meu responsável.

Assim, concordo em participar da pesquisa.

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

Botucatu, ___ de _____de 20__

_____ Assinatura do voluntário maior de 18 anos

_____ Assinatura do responsável

_____ Assinatura do pesquisador

_____ Assinatura da adolescente maior de 11 anos

Pesquisadores:

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

José Carlos Peraçoli – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP
Fone: (14) 3880-1015

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

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

Ingrid Cristina Weel – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP
Fone: (14)3880-0431

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

"ENVOLVIMENTO DE INFLAMASSOMO E AUTOFAGIA NA FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPSIA"

Projeto 1: Avaliação de inflamassomo NLRP3 e autofagia em placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Projeto 2: Envolvimento do inflamassomo na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Projeto 3: Analise do inflamassomo NLRP3 induzido por ácido úrico em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Eu, _____, doadora de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, fui convidada a participar da pesquisa para 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 e como é a resposta do organismo de mulheres não grávidas. Nesta pesquisa, fui solicitado 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. 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.

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

_____ Assinatura do pesquisador

Pesquisadores:

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

José Carlos Peraçoli – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP
Fone: (14) 3880-1015

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

Ingrid Cristina Weel – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP
Fone: (14)3880-0431

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

ANEXO 4 – Comprovante de Encaminhamento para Publicação

Submission Confirmation for PONE-D-15-03754 - [EMID:29a9b4340bf026cb]

De: PLOS ONE
Para: tperacoli@uol.com.br
Cópia:
Cópia oculta:
Assunto: Submission Confirmation for PONE-D-15-03754 - [EMID:29a9b4340bf026cb]
Data: 26/01/2015 10:38

PONE-D-15-03754
Endogenous and Uric Acid-induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia
PLOS ONE

Dear Prof. Peracoli,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Endogenous and Uric Acid-induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia" to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-15-03754.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at http://pone.edmgr.com/.

Please visit EveryONE (http://blogs.plos.org/everyone), the PLOS ONE community blog for our published authors and readers, to find out what the journal is thinking, changing and doing.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,
PLOS ONE

⚠ Lembre-se: sua senha de acesso no UOL Mail é secreta; não a informe a ninguém.
O UOL Mail jamais solicitará sua senha por e-mail ou por telefone. Trocar senha.