

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta Tese
será disponibilizado somente a partir
de 25/05/2023.



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

Vanessa Rocha Ribeiro

**Efeito imunomodulador da vitamina D e silibinina
sobre subpopulações de células T CD4+ em
gestantes portadoras de pré-eclâmpsia**

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

Orientadora: Prof^a. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Coorientadora: Dr^a. Mariana Romão Veiga

**Botucatu
2021**

Vanessa Rocha Ribeiro

**Efeito imunomodulador da vitamina D e silibinina
sobre subpopulações de células T CD4+ em
gestantes portadoras de pré-eclâmpsia**

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

Orientadora: Prof^a. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Coorientadora: Dr^a. Mariana Romão Veiga

Botucatu

2021

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

Ribeiro, Vanessa Rocha.

Efeito imunomodulador da vitamina D e silibinina sobre subpopulações de células T CD4+ em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Vanessa Rocha Ribeiro. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Coorientador: Mariana Romão Veiga

Capes: 40101150

1. Pré-eclâmpsia. 2. Silibina. 3. Fatores imunológicos. 4. Grávidas. 5. Vitamina D.

Palavras-chave: PBMCs; Pré-eclâmpsia; Silibinina; Subpopulações de células T; Vitamina D.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia da Reprodução

Departamento de Ciências Químicas e Biológicas

Setor Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu.

Financiamento



Bolsa CAPES – Doutorado

Período de vigência: Março/2017 – Março/2018



Bolsa FAPESP – Doutorado

Processo nº 2016/23450-0

Período de vigência: Abril/2018 – Abril/2021

Auxílio regular à Pesquisa

Processo nº 2016/18155-9

Período de vigência: Fevereiro/2017 – Julho/2019

DEDICATÓRIA



Dedico esse trabalho aos meus pais.

Ao meu pai Nivaldo (*in memorian*) que ilumina e guia a minha trajetória desde o dia que se tornou o meu anjo da guarda. Ele foi um exemplo como homem, pai e amigo. Sempre contagiou à todos pela sua alegria de viver, pelas lutas diárias e superação. Meu pai se esforçou muito para me proporcionar um estudo de qualidade. Seus maiores sonhos era me ver formada e pós-graduada na UNESP. Hoje, sou muito grata por ter conseguido realizar os desejos dele. Apesar de não estar presente, tenho certeza aonde ele se encontra, receberá todo o meu amor e retribuição por tudo que fez por mim. Obrigada Pai, meu amor eterno.

“Eu não estou longe, apenas estou do outro lado do Caminho...”

Santo Agostinho

À minha mãe Leda, minha heroína, que exerce o papel de mãe e de pai. Ela que me ensina e inspira todos os dias como ser uma SUPER mulher, mãe, amiga e batalhadora. Esse momento da minha formação se torna ainda mais especial por tê-la ao meu lado e ser a razão dos meus esforços para chegar até aqui. Hoje, todo o meu agradecimento é para ela, que muitas vezes se abdicou dos seus sonhos para realizar o meu. Obrigada por todo amor, carinho, incentivo, admiração e ensinamentos. Obrigada Mãe, meu amor incondicional.

Os pais que Deus me presenteou com muito amor.

AGRADECIMENTOS



AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por ter me concebido à oportunidade de conhecer o seu laboratório em 2011 e desde então, ter sido orientada por ela, uma honra para mim. Tizinha, é um exemplo de ser humano, amiga, professora e pesquisadora. Agradeço por ter compartilhado os seus ensinamentos durante todos esses anos, que foram além da imunologia, sempre preocupada com o meu futuro, felicidade e realização tanto profissional quanto pessoal. Essa conquista só foi possível graças à sua orientação. Obrigada por ter sonhado comigo.

Minha eterna gratidão!

“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha juntos é o começo da realidade”.

Cervantes

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu irmão Junior, uma das pessoas mais importantes da minha vida. Agradeço por vibrar com cada conquista minha, pela nossa união, por representar tão bem o nosso pai e todo o seu amor à mim. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Eu te amo demais.

Ao meu noivo Caio, agradeço por toda nossa história construída e que iremos construir juntos, por acreditar no meu potencial, me fazer acreditar que posso mais que imagino, não medir esforços para me ver feliz e por ter me feito evoluir como ser humano, me presenteando com o nosso primeiro amor, o Chico Pug. Te amo muito.

À minha coorientadora e minha amiga Mariana, por ter sido essencial em toda a minha trajetória acadêmica, sempre disposta à me ajudar, ensinar, incentivar e acima de tudo pela nossa amizade. Sem você esse trabalho não seria completo.

À minha amiga Priscila, minha companheira desde a iniciação científica até o Doutorado, agradeço por todas as etapas da formação terem sido vivenciadas ao seu lado e por ter dividido comigo alegrias, choros, frustrações, experimentos, estágios docência, pedidos de bolsa, momentos tão importantes que ficarão para sempre em meu coração.

À minhas amigas Mariana e Amanda, que apesar de terem finalizados seus estudos no laboratório, mesmo com a distância estavam presentes no meu dia a dia, sempre com mensagens alegres, palavras de carinho e comemorando as conquistas uma das outras.

À todos que passaram pelo Laboratório de Imunologia da Reprodução pelo aprendizado de trabalhar em equipe e conhecer pessoas especiais.

Aos meus familiares Rocha e Ribeiro, que sempre me ensinam o verdadeiro significado de uma família.

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

À Cássia, por seu cuidado e dedicação à minha família e com o Chico durante todos esses anos.

Ao Professor José Maurício, do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, SETOR- Microbiologia e Imunologia, responsável pelo laboratório de citometria de fluxo, por todo seu cuidado e atenção em resolver os problemas para que o aparelho estivesse sempre disponível aos alunos. Agradeço também pela oportunidade de realizar estágio docência sob sua supervisão e pelas futuras colaborações em pesquisas.

À Dr^a Graziela e Dr^a Larissa, por me auxiliarem na elaboração de uma parte fundamental dos meus trabalhos e por destinarem o seu tempo para participarem dessa pesquisa.

Ao Professor João Pessoa do Instituto de Biotecnologia da UNESP, pela contribuição na técnica de biologia molecular dessa tese.

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

Ao Dr. Peraçoli, Dr Joélcio e aos demais docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela cuidadosa seleção das pacientes e por estarem disponíveis a contribuir com a pesquisa.

À Suzi Helena, funcionária da maternidade do Hospital das Clínicas de Botucatu, sempre pronta para me ajudar nas coletas de material das gestantes.

Às gestantes que aceitaram participar desse estudo, pois sem elas nada disso seria possível.

Ao programa de Pós-graduação em Tocoginecologia, por possibilitar a realização desse trabalho e aos funcionários pela disponibilidade, atenção, simpatia, gentileza e eficiência em todas as necessidades.

Aos professores e professoras que passaram pela minha caminhada até o fim do doutorado e àqueles que gentilmente colaboraram com o texto da qualificação e da tese, em especial aos professores que aceitaram participar da banca de defesa.

À CAPES e FAPESP (Processo nº 2016/23450-0), pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto.

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



“A ciência é a experiência, e a experiência é um manto que se tece ao longo de vários séculos; e quanto mais o manto se estende, mais a ciência é completa e segura”.

Carlo Bini

PREFÁCIO



O documento da Tese para obtenção do título de Doutora em Tocoginecologia, intitulado “Efeito imunomodulador da vitamina D e silibinina sobre subpopulações de células T CD4⁺ em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia” encontra-se dividido em 6 partes:

Inicialmente, a Introdução aborda uma revisão a respeito da patogênese da pré-eclâmpsia (PE) e suas manifestações clínicas. Também é apresentada a literatura relacionada à resposta imune adaptativa, à diferenciação dos linfócitos T *helper* (Th)- CD4, assim como, o papel da vitamina D (VD) e da silibinina (SB) na pré-eclâmpsia.

O capítulo I contempla o manuscrito intitulado “Vitamin D modulates the transcription factors of T cell subsets to anti-inflammatory and regulatory profiles in preeclampsia”, que foi submetido à publicação ao periódico Journal of Reproductive Immunology. Os resultados desse manuscrito mostram que o tratamento in vitro com a VD sobre as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), diminuiu a expressão gênica dos fatores de transcrição característicos das subpopulações inflamatórias (Th1 e Th17) e aumentou os fatores de transcrição referente aos perfis anti-inflamatórios (Th2) e regulador (Treg) em gestantes com pré-eclâmpsia. Assim, sugere-se que a resposta inflamatória sistêmica observada na PE pode ser decorrente de um desequilíbrio na homeostase do sistema imunológico materno, causado pela diminuição do hormônio VD, capaz de regular a inflamação.

O capítulo II é composto pelo manuscrito “Immunomodulatory effect of vitamin D on the activators of transcription and transcription factors of CD4⁺ T cell subsets in pregnant women with preeclampsia” que será enviado para publicação e apresenta os resultados da análise proteica dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), os fatores de transcrição das subpopulações de células T CD4⁺ e as citocinas relacionadas aos perfis. Os resultados demonstraram o efeito imunomodulador in vitro da VD sobre a imunidade adaptativa, favorecendo o aumento de STATs, dos fatores de transcrição dos perfis Th2 e Treg e das citocinas relacionadas às células T em gestantes com PE. Esse manuscrito, evidenciou a capacidade da VD em modular uma importante via de sinalização JAK/STAT, restaurando o desequilíbrio das subpopulações de células T CD4⁺ observado na PE.

O capítulo III está apresentado em forma de manuscrito que será enviado para publicação, intitulado “Silibinin downregulates the expression of the Th1 and Th17 profiles by the modulation of STATs and transcription factors in pregnant women with preeclampsia”. Foi relatado o papel do flavonoide silibinina na modulação da via JAK/STAT, com a diminuição dos ativadores de transcrição e dos fatores de transcrição de perfis inflamatórios, além da diminuição das citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T CD4⁺ em gestantes portadoras de PE. Sendo assim, o papel modulador da silibinina parece ter grande importância na imunidade adaptativa. Considerando que nosso grupo de pesquisa apresenta conhecimento prévio sobre o emprego in vitro de SB, com vários trabalhos associados a PE publicados em periódicos internacionais e, que não há resultados sobre o efeito desse flavonoide sobre as subpopulações de células T, decidiu-se acrescentar essa análise devido às suas propriedades anti-inflamatória, anti-oxidante e imunomoduladora já descritas em outras patologias, com processos inflamatórios intensificados. Dessa forma, são apresentados resultados obtidos de 16 gestantes pré-eclâmpicas e 16 gestantes normotensas (NT).

Finalizando a presente tese de Doutorado encontram-se as conclusões gerais baseadas nos 3 capítulos que compreenderam esse estudo, os anexos referentes aos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	15
RESUMO	17
INTRODUÇÃO	18
Capítulo I.....	34
Capítulo II.....	60
Capítulo III	94
CONCLUSÕES	117
ANEXOS	120

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Alexa 647: fluorocromo alexa fluor 647

APC-H7: fluorocromo alofocianina conjugado com o análogo de um cianina 7

BB515: fluorocromo azul brilhante 515

CBA: *cytometric bead array*

CD: *cluster* of diferenciação

CD127: *cluster* de diferenciação 127, molécula marcadora de células efetoras

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

CD3: *cluster* de diferenciação 3, molécula marcadora de células T

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

cDNA: DNA complementar

CO₂: dióxido de carbono

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

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

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase

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

h: horas

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IFN-γ: interferon gama

IL: interleucina

IL-23R: receptor da interleucina 23

IκB: proteína inibitória da via de sinalização de NF-κB

LPS: lipopolissacarídeo

M1: monócitos classicamente ativados

M2: monócitos alternativamente ativados

mg: miligramas

MIF: mediana de intensidade de fluorescência

mL: mililitro

mm: milímetro

mmHg: milímetro de mercúrio

NF-κB: fator nuclear kappa B

NK: célula natural *killer*

NLRP: receptor *NOD-like*

nM: nanomolar

NT: normotensa

°C: graus Celsius

p: nível de significância

PA: pressão arterial

PBMCs: células monucleares do sangue periférico

PBS: solução salina tamponada, *phosphate buffered saline*

PE: fluorocromo ficoeritrina

PE: pré-eclâmpsia

PE-Cy7: fluorocromo ficoeritrina conjugado com corante cianina

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

pg: picograma

PGE₂: prostaglandina E2

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RNA: ácido ribonucleico

RORγt: *retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma t*

rpm: rotações por minuto

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

Runx1: *runt-related transcription factor 1*

RXR: receptor retinoide X

SB: silibinina

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*. Transdutor de sinal e ativador da transcrição

STAT1: transdutor de sinal e ativador da transcrição 1

STAT3: transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

STAT4: transdutor de sinal e ativador da transcrição 4

STAT5: transdutor de sinal e ativador da transcrição 5

STAT6: transdutor de sinal e ativador da transcrição 6

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

TGF- β 1: fator transformador do crescimento beta 1

Th1: célula T *helper* 1

Th17: célula T *helper* 17

Th2: célula T *helper* 2

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

Treg: célula T reguladora

U/mL: unidade por mL

UVB: raios ultravioleta

VD: vitamina D

VDBP: proteína de ligação à vitamina D

VDR: receptor de vitamina D

μ g: micrograma

μ M: micromolar

%: percentagem

1,25 (OH)D: 1,25-dihidroxitamina D

25(OH)D: 25-hidroxitamina D

RESUMO

Na pré-eclâmpsia (PE) ocorre um estado de má adaptação da tolerância imunológica, caracterizado por ativação anormal do sistema imune inato e adaptativo. A ocorrência de uma resposta inflamatória sistêmica parece ser devida ao desbalanço das subpopulações de células T CD4, causado por aumento do número de células de perfis inflamatórios T helper 1 (Th1) e Th17 e diminuição das células características dos perfis anti-inflamatório e regulador, Th2 e T reg respectivamente. Portanto, o desbalanço entre as subpopulações de células T pode ser crítico para a tolerância ao feto e para prevenção da PE. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito imunomodulador, in vitro, da vitamina D (VD) e da silibinina (SB) sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de gestantes pré-eclâmplicas, com ênfase em subpopulações de células Th. Foram estudadas 20 gestantes portadoras de PE e 20 gestantes normotensas (NT), pareadas pela idade gestacional. Sangue periférico foi obtido das gestantes de ambos os grupos para determinação da concentração plasmática de VD [25(OH)D]. O efeito imunomodulador da VD e da SB sobre as subpopulações de células T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17 e Treg) foi avaliado quanto à expressão dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) para as células Th1 (STAT1 e STAT4), Th2 (STAT6), Th17 (STAT3) e Treg (STAT5) e dos fatores de transcrição intracelulares para células Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3), Th17 (ROR γ t e Runx1) e Treg (FoxP3) por PCR quantitativo (qPCR) e/ou citometria de fluxo. As citocinas relacionadas às subpopulações de células Th, as pró-inflamatórias, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-22 e IL-23 e as anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , produzidas por PBMCs de gestantes pré-eclâmplicas e NT foram determinadas pelos métodos de *cytometric bead array* (CBA) e/ou Elisa. De maneira geral, os resultados mostraram que o tratamento in vitro com VD e SB é capaz de modular o desbalanço das subpopulações de células T presente na PE, diminuindo os fatores de transcrição, os ativadores de transcrição e citocinas característicos dos perfis inflamatórios e aumentando os relacionados aos perfis anti-inflamatório e regulador. Assim, o entendimento da modulação das subpopulações de células T por agentes com ações imunomoduladoras e anti-inflamatórias, como VD e SB, poderá contribuir para a melhor compreensão do envolvimento da imunidade adaptativa na fisiopatologia da PE e possivelmente propor formas alternativas para o tratamento dessa importante patologia da gestação.

Palavras-chave: PBMCs, pré-eclâmpsia, subpopulações de células T, citocinas, vitamina D e silibinina.

References

- [1] Rana, S., Lemoine, E., Granger, J.P., Karumanchi, S.A. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res.* 2019; 124:1094-1112.
- [2] American College of Obstetricians and Gynecologists. Acog practice bulletin number 222. Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology.* 2020; 135 (6): e237-e260.
- [3] Tranquilli, A. L., Dekker, G., Magee, L., Roberts, J., Sibai, B.M., Steyn, W., Zeeman, G.G., Brown, M.A. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 2014; 4:97-104.
- [4] Mol, B.W., Roberts, C.T., Thangaratinam, S., Magee, L.A., de Groot, C.J., Hofmeyr, G.J. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2016; 387:999-1011.
- [5] Chen, G.Y., Nunez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:826–837.
- [6] Negishi, Y., Shima, Y., Takeshita, T., Morita, R. Harmful and beneficial effects of inflammatory response on reproduction: sterile and pathogen-associated inflammation. *Immunol. Med.* 2020; 24:1-18.
- [7] Ribeiro, V.R., Romao-Veiga, M., Romagnoli, G.G., Matias, M.L., Nunes, P.R., Borges, V.T.M., Peracoli, J.C., Peracoli, M.T.S. Association between cytokine profile and transcription factors produced by T-cell subsets in early- and late-onset pre-eclampsia. *Immunology.* 2017; 152:163-173.
- [8] Conforti-Andreoni, C., Spreafico, R., Qian, H.L., Riteau, N., Ryffel, B., Ricciardi-Castagnoli, P., Mortellaro, A. Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. *J Immunol.* 2011; 187:5842-5850.

- [9] Saito, S., Shiozaki, A., Sasaki, Y., Nakashima, A., Shima, T., Ito, M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. *Semin Immunopathol.* 2007; 29:115-122.
- [10] Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., Ito, M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63:601-610.
- [11] Figueiredo, A.S., Schumacher, A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology.* 2016; 148:13-21.
- [12] Eghbal-Fard, S., Yousefi, M., Heydarlou, H., Ahmadi, M., Taghavi, S., Movasaghpour, A., Jadidi-Niaragh, F., Yousefi, B., Dolati, S., Hojjat-Farsangi, M., Rikhtegar, R., Nouri, M., Aghebati-Maleki, L. The imbalance of Th17/Treg axis involved in the pathogenesis of preeclampsia. *J Cell Physiol.* 2019; 234:5106-5116.
- [13] Xin, P., Xu, X., Deng, C., Liu, S., Wang, Y., Zhou, X., Ma, H., Wei, D., Sun, S. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *Int Immunopharmacol.* 2020; 80:106210.
- [14] Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., Bahar, M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal.* 2017; 15:23.
- [15] van Rijn, B.B., Franx, A., Steegers, E.A., de Groot, C.J., Bertina, R.M., Pasterkamp, G., Voorbij, H.A., Bruinse, H.W., Roest, M. Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS ONE.* 2008; 3:e1865.
- [16] Abenavoli, L., Izzo, A.A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., Capasso, R. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother Res.* 2018; 32:2202-2213.
- [17] Kren, V., Walterová, D. Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005; 149:29-41.
- [18] Agarwal, R., Agarwal, C., Ichikawa, H., Singh, R.P., Aggarwal, B.B. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res.* 2006; 26:4457-4498.
- [19] Deep, G., Agarwal, R. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29:447-463.
- [20] Gomes, V.J., Nunes, P.R., Matias, M.L., Ribeiro, V.R., Devides, A.C., Bannwart-Castro, C.F., Romagnoli, G.G., Peraçoli, J.C., Peraçoli, M.T.S, Romao-Veiga, M. Silibinin induces in vitro M2-like phenotype polarization in monocytes from preeclamptic women. *Int Immunopharmacol.* 2020; 89:107062.
- [21] Giorgi, V.S., Peracoli, M.T., Peracoli, J.C., Witkin, S.S., Bannwart-Castro, C.F. Silibinin modulates the NF- κ b pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol.* 2012; 95:67-72.
- [22] Cristofalo, R., Bannwart-Castro, C.F., Magalhães, C.G., Borges, V.T., Peraçoli, J.C., Witkin, S.S., Peraçoli, M.T. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res.* 2013; 47: 268-275.

- [23] Esmaeil, N., Anaraki, S.B., Gharagozloo, M., Moayedi, B. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. *Int Immunopharmacol.* 2017; 50:194-201.
- [24] O'Shea, J.J., Plenge, R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity.* 2012; 36:542-550.
- [25] Benveniste, E.N., Liu, Y., McFarland, B.C., Qin, H. Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Interferon Cytokine Res.* 2014; 34:577-588.
- [26] O'Shea, J.J., Schwartz, D.M., Villarino, A.V., Gadina, M., McInnes, I.B., Laurence, A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med.* 2015; 66:311-328.
- [27] O'Shea, J.J., Murray, P.J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity.* 2008; 28:477–487.
- [28] Chen, Z., Laurence, A., O'Shea, J. J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars. Immunol.* 2007; 19:400–408.
- [29] Burchill, M. A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B. R., Farrar, M. A. IL-2 receptor β -dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2007; 178: 280–290.
- [30] Matias, M.L., Gomes, V.J., Romao-Veiga, M., Ribeiro, V.R., Nunes, P.R., Romagnoli, G.G., Peracoli, J.C., Peracoli, M.T.S. Silibinin Downregulates the NF- κ B Pathway and NLRP1/NLRP3 Inflammasomes in Monocytes from Pregnant Women with Preeclampsia. *Molecules.* 2019; 24:1548.
- [31] Gomes, V.J., Nunes, P.R., Matias, M.L., Ribeiro, V.R., Devides, A.C., Bannwart-Castro, C.F., Romagnoli, G.G., Peraçoli, J.C., Peraçoli, M.T.S., Romao-Veiga, M. Silibinin induces in vitro M2-like phenotype polarization in monocytes from preeclamptic women. *Int Immunopharmacol.* 2020; 89:107062.
- [32] Tong, W.W., Zhang, C., Hong, T., Liu, D.H., Wang, C., Li, J., He, X.K., Xu, W.D. Silibinin alleviates inflammation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and has a therapeutic effect on arthritis in rats. *Sci Rep.* 2018; 8:3241.
- [33] Oh, H., Ghosh, S. NF- κ B: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev.* 2013; 252:41-51.
- [34] Hayden, M.S., Ghosh, S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* 2011; 21:223-244.
- [35] Corn, R.A., Hunter, C., Liou, H.C., Siebenlist, U., Boothby, M.R. Opposing roles for RelB and Bcl-3 in regulation of T-box expressed in T cells, GATA-3, and Th effector differentiation. *J Immunol.* 2005; 175:2102-2110.
- [36] Hilliard, B.A., Mason, N., Xu, L., Sun, J., Lamhamedi-Cherradi, S.E., Liou, H.C., Hunter, C., Chen, Y.H. Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J Clin Invest.* 2002; 110(6):843-850.
- [37] Das, J., Chen, C.H., Yang, L., Cohn, L., Ray, P., Ray, A. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol.* 2001; 2:45-50.

- [38] Ruan, Q., Kameswaran, V., Zhang, Y., Zheng, S., Sun, J., Wang, J., DeVigiliis, J., Liou, H.C., Beg, A.A., Chen, Y.H. The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR γ -ROR γ T transcriptional axis. *J Exp Med*. 2011; 208:2321-2333.
- [39] Long, M., Park, S.G., Strickland, I., Hayden, M.S., Ghosh, S. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity*. 2009; 31:921-931.
- [40] Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., Rudensky, A.Y. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*. 2010; 463:808-812.
- [41] Lin, W.W., Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007; 117:1175-1183.

CONCLUSÕES



Conclusões Gerais

- Em conclusão, o presente estudo demonstrou que gestantes portadoras de PE apresentam níveis plasmáticos de VD, significativamente menores em relação às gestantes NT. O tratamento *in vitro* de PBMCs com VD induziu polarização das subpopulações de células T com perfis anti-inflamatório (Th2) e regulador (Treg), detectada pelo efeito imunomodulador da VD sobre a expressão gênica dos fatores de transcrição característicos dessas células no grupo PE. Assim, sugere-se que a resposta inflamatória sistêmica observada na PE pode ser decorrente de um desequilíbrio na homeostase do sistema imunológico materno, causado pela diminuição do hormônio VD, capaz de regular a inflamação.
- A análise da expressão proteica dos ativadores de transcrição (STATs) e dos fatores de transcrição das subpopulações de células T CD4⁺, bem como das citocinas produzidas por essas células mostrou que o tratamento *in vitro* das células com VD modulou negativamente os perfis inflamatórios Th1/Th17, induzindo polarização das subpopulações de células T para os perfis Th2/Treg com produção de citocinas anti-inflamatórias, mediada pela via de sinalização JAK/STAT, nas gestantes com PE.
- A avaliação do tratamento *in vitro* das PBMCs de gestantes pré-eclâmpticas com SB mostrou que esse flavonoide parece modular a via JAK/STAT, induzindo diminuição dos ativadores de transcrição e dos fatores de transcrição de perfis inflamatórios, além da diminuição das citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T CD4⁺ em gestantes portadoras de PE. Sendo assim, o papel modulador da SB parece ter grande importância na imunidade adaptativa.
- Portanto, a inflamação estéril presente na PE, parece ser decorrente de um desbalanço entre as subpopulações de células T. O emprego de agentes com propriedades imunomoduladoras como a VD e SB, capazes de restabelecer o desequilíbrio do sistema imune adaptativo materno pode ser uma nova alternativa adjuvante no tratamento da resposta inflamatória sistêmica que ocorre na PE.