LEONARDO TEIXEIRA LOPES DE MEDEIROS

CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS M1 E M2 E ASSOCIAÇÃO COM PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPSIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área de Concentração – Tocoginecologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

UNESP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Medeiros, Leonardo Teixeira Lopes de.
Caracterização das subpopulações de monócitos M1 e M2 e associação com produção de citocinas em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Capes: 40101150

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

Palavras-chave: Citocinas; Pré-eclâmpsia; Subpopulações de monócitos; Receptores TLR; Subpopulações de monócitos.

Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – Unesp – Botucatu, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo nº 2009/11924-3

Dedicatória

A Deus, que sempre me fortalece em todos os meus momentos de fraqueza, tornando-me capaz de enfrentar todo e qualquer obstáculo. Agradeço ao meu Senhor que me ampara diante de minhas dificuldades e que sempre está presente em minha vida, guiando os meus passos, abençoando os meus caminhos. A Deus, que jamais me abandona nos meus momentos de trevas, dando-me consolo e proteção.

À minha família que, apesar da distância física, sempre esteve presente em telefonemas diários, dando-me muita força e incentivo em meu mestrado. Palavras não são suficientes para descrever o amor imenso que tenho pelos meus pais Milton e Sônia e pela minha irmã Lívia, os quais foram fundamentais para minha formação. Eu nada seria sem a participação ativa deles ao longo da minha vida, que tanto amor e atenção me dedicam, que tamanha confiança depositam em mim.

Aos meus avós João e Maria José que, juntamente com meus pais, foram essenciais para minha educação, onde através de suas experiências de longa vivência me mostram o sentido e a beleza da vida a cada dia que passa.

À minha namorada Janaína pelo total apoio que me dá em todas as horas da minha vida, pela compreensão e paciência que teve comigo ao me acompanhar constantemente na execução de todo este trabalho, mostrando o quão forte é o amor que sentimos um pelo outro, o quanto o destino foi generoso quando nossos caminhos se cruzaram para a plena felicidade.

Agradecimentos

Ao longo desses 2 anos de mestrado, grandioso foi meu amadurecimento, intenso foi meu aprendizado. Muitas coisas boas aconteceram dentro do laboratório ao longo desse período, que me fizeram ver o mundo de maneira mais ampla, mais positiva, tornando-me, dessa maneira, mais feliz. Assim, agradeço de todo meu coração a minha orientadora Terezinha Peraçoli, detentora de uma grandiosa competência e sabedoria, a qual foi uma verdadeira mãe para mim, presente em todos os meus instantes de necessidade. Agradeço por ter sido tão carinhosa e paciente comigo. Serei eternamente grato pela dedicação e confiança, pela amizade e ternura, por ser uma pessoa que transmite uma imensa paz de espírito. Serei eternamente grato pelo meu privilégio de ter tido uma orientadora brilhante e exemplar, que estará para sempre presente em meu coração.

Agradeço as minhas amigas Érika, Camila, Mariana, Ingrid e as duas Vanessas, as quais foram muito mais que colegas de laboratório, fundamentais para a realização do meu trabalho devido ao intenso auxílio que me prestaram, pela paciência diante de falhas e dificuldades nos procedimentos e por terem proporcionado um ambiente alegre, divertido, animado, onde sempre imperou a união. Agradeço pelo apoio que me prestaram em momentos tensos da minha vida, mostrando que a amizade foi verdadeira, assim como sempre será onde quer que estejamos.

Sou grato a toda equipe médica e de enfermagem, que se mostraram sempre prontas a me ajudar de maneira eficaz. Faço um agradecimento especial à enfermeira Claudete que fez as coletas das pacientes portadoras de pré-eclâmpsia, assim como agradeço de todo meu coração ao doutor José Carlos Peraçoli, à doutora Vera, à doutora Cláudia, ao doutor Roberto e peço minhas sinceras desculpas caso eu tenha esquecido de citar alguém. Agradeço a enfermeira Olinda que todas as quintas-feiras à tarde no ambulatório se prontificava em fazer as coletas das gestantes normotensas.

Sou grato às gestantes que participaram deste trabalho, fazendo com que fosse possível sua execução, possibilitando o esclarecimento de diversos aspectos dentro desta pesquisa.

Agradeço a equipe do hemocentro, em especial as funcionárias Márjorie, Valéria e Viviane da citometria de fluxo, que disponibilizaram o citômetro, mostrando sempre dispostas a fazer todas as leituras e análises das amostras, apesar dos horários estarem sempre apertados em função da intensa rotina do hospital.

Agradeço a todos os funcionários da seção da pós-graduação e do departamento de Ginecologia e Obstetrícia, sempre ágeis em prestar seus serviços e informações com total educação, respeito e competência.

SUMÁRIO

Artigo de revisão.....1
Ativação da imunidade inata na pré-eclâmpsia
Referências Bibliográficas

Artigo original.....22
Caracterização das subpopulações de monócitos M1 e M2 e associação com produção de citocinas em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Resumo.....23

Abstract.....25

Introdução.....27

Objetivos.....30

Casuistica e Métodos.....30

Resultados.....36

Discussão.....49

Conclusões.....56

Referências Bibliográficas.....57

Anexo.....68

ARTIGO DE REVISÃO

ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE INATA NA PRÉ-ECLÂMPSIA

A pré-eclâmpsia é uma síndrome específica da gravidez que incide entre 5% e 7% das gestantes (Walker, 2000; Roberts & Cooper, 2001). Tem distribuição mundial e incide principalmente em primigestas, sendo considerada a principal causa de mortalidade materna e perinatal, principalmente nos países em desenvolvimento (Sibai et al., 2005). O diagnóstico é feito, na maioria das vezes, no terceiro trimestre de gravidez, sendo que a gravidade da doença é maior quanto mais precoce acontece sua manifestação clínica (De Oliveira et al., 2010).

É uma doença sistêmica, caracterizada por múltiplas alterações no organismo materno (Wegmann et al., 1993) e clinicamente identificada pela manifestação, na segunda metade da gestação, de hipertensão arterial e proteinúria, podendo ocorrer outros distúrbios sistêmicos (Roberts & Redman, 1993; Rein et al., 2003; Paternoster et al., 2004; De Oliveira et al., 2010).

A pré-eclâmpsia é classificada em leve ou grave, de acordo com sinais e sintomas apresentados (ACOG, 2002) e recentemente, em precoce ou tardia, na dependência do aparecimento das manifestações clínicas antes da 34ª. ou a partir da 34ª. semana de gestação, respectivamente (von Dadelszen et al., 2003; Huppertz, 2008).

Segundo Huppertz (2008), em relação ao momento do aparecimento da doença (precoce ou tardio), a pré-eclâmpsia deve ser considerada como duas entidades, que diferem quanto à sua etiologia e quanto à forma de manifestação da doença. Quando seu aparecimento é precoce apresenta-se na forma grave e está geralmente associada com resultado anormal do Doppler da artéria uterina, feto com restrição de crescimento intra-uterino, resultados maternos e neonatais ruins (Murphy & Stirrat, 2000; Ness & Sibai, 2006), assim como a maior taxa de recorrência (Redman & Sargent, 2005). Por outro lado, a pré-eclâmpsia de início tardio está frequentemente associada com índice de resistência uterina normal ou discretamente aumentado, baixa taxa de

comprometimento fetal e resultados perinatais mais favoráveis (Sibai et al., 2005; Ness & Sibai, 2006).

De acordo com Moldenhauer et al. (2003), na pré-eclâmpsia de início precoce identificam-se lesões isquêmicas placentárias, o que não se verifica na pré-eclâmpsia de início tardio. Assim, a pré-eclâmpsia precoce decorre de um defeito da invasão das células citotrofoblásticas nas arteríolas espiraladas com consequente anomalia da remodelação vascular placentária, na ausência de alterações primárias do sistema vascular materno. Seu componente genético familiar é mais acentuado e seu prognóstico mais sombrio. Por outro lado, a pré-eclâmpsia tardia resulta da interação entre uma placenta normal e o comprometimento pré-gravídico da rede vascular materna. Esta vasculopatia materna é favorecida por fatores de risco vascular inespecíficos como diabete, idade, hipertensão arterial e índice de massa corpóreo aumentado. Representa um obstáculo ao desenvolvimento da vascularização, observado fisiologicamente no final da gestação, em resposta a importantes necessidades hemodinâmicas fetoplacentárias (Boulanger & Flamant, 2007).

Embora a etiologia da pré-eclâmpsia ainda não esteja esclarecida, está demonstrado que sua fisiopatologia é influenciada diretamente pela placenta (Robillard, 2002; Redman & Sargent, 2005). Essa doença resultaria do desbalanço entre fatores produzidos pela placenta e a adaptação materna a estes fatores. Assim, a pré-ecâmpsia precoce é o resultado de uma placentação pobre no início da gravidez (8-18 semanas), que se relaciona com a falha na remodelação das arteríolas espiraladas, comprometendo o suprimento da circulação útero-placentária. A placentação normal requer a invasão do sítio placentário pelo citotrofoblasto, permitindo o contato deste com os tecidos maternos (Redman & Sargent, 2010). Portanto, a falha na invasão trofoblástica das arteríolas espiraladas materna seria o mecanismo central do desenvolvimento da pré-eclâmpsia (Tranquilli & Landi, 2010).

Fundamentada nesse conceito, a literatura sugere a interação de vários mecanismos responsáveis pela característica multisistêmica da doença: placentação inadequada (Pijnenborg et al., 1983; Redman & Sargent, 2010), disfunção endotelial (Khan et al., 2005), angiogênese insuficiente (Levine et al., 2006), má adaptação imunológica (Dekker & Sibai, 1999), estresse oxidativo (Gupta et al., 2005; Redman & Sargent, 2000; 2005), trombose e ativação do

sistema renina-angiotensina-aldosterona (Elsheikh et al., 2001) e resposta inflamatória excessiva (Redman et al., 1999; Redman & Sargent, 2003). Portanto, entende-se a pré-eclâmpsia como uma doença multisistêmica caracterizada por intensa resposta inflamatória, agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação, aumento da resistência vascular generalizada e lesão endotelial (De Oliveira et al., 2010).

A disfunção endotelial sistêmica materna, comprometendo todos os órgãos, explica aspectos clínicos associados com a pré-eclâmpsia, como por exemplo, o desenvolvimento da hipertensão (Dusse et al., 2011). Nos pulmões, o comprometimento endotelial e a conseqüente permeabilidade vascular exagerada podem culminar com o edema pulmonar. O dano vascular hepático, associado ao consumo exagerado de plaquetas e a hemólise sistêmica caracterizam o que se denomina “síndrome HELLP” (*hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets*). A lesão endotelial cerebral determina edema difuso e o quadro convulsivo, caracterizando a eclâmpsia (De Oliveira et al., 2010). Apesar do curto tempo de exposição do coração à hipertensão, estudos hemodinâmicos mostram que o coração responde ao aumento agudo e transitório na pós-carga (Valensise et al., 2001; Valensise et al., 2001a; Vásquez Blanco et al., 2000; 2001, 2001a), sofrendo um processo de adaptação caracterizada por hipertrofia concêntrica, sem prejuízo da função ventricular (Magalhães et al., 2008).

A gestação normal é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica leve, presente desde a fase luteínica do ciclo menstrual, antes da implantação do ovo e que se desenvolve com a evolução da gestação (Borzychowski et al., 2006). Essas alterações inflamatórias leves, resultantes da ativação da imunidade inata, não indicam doença, mas um mecanismo de proteção do organismo materno contra infecções, uma vez que a reatividade da resposta imune específica se encontra ligeiramente diminuída (Wegmann et al., 1993). A adaptação materna à gestação requer uma interação proeminente e controlada entre as imunidades inata e adaptativa, para permitir o crescimento e o desenvolvimento normais do semi-enxerto fetal (van Rijn et al., 2008).

Na pré-eclâmpsia ocorre uma reação inflamatória sistêmica, semelhante à observada na gestação normal, porém de maior intensidade (Redman et al., 1999). Portanto, a pré-eclâmpsia resulta da ativação exacerbada da resposta

inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias, como monócitos e granulócitos, bem como células endoteliais, que são parte do sistema inflamatório (Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006). Essa patologia é caracterizada por 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 (TGF-β) (Pestka et al., 2004; Visser et al., 2007; Peraçoli et al., 2008).

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

A placenta expressa intenso estresse oxidativo (Burton & Jauniaux, 2004; Myatt & Cui, 2004), resultante de lesão causada por hipoxia e reperfusão (Burton & Hung, 2003) e/ou deficiência das defesas antioxidantes (Perkins, 2006), que contribuem para o aumento do estresse oxidativo sistêmico da pré-eclâmpsia (Roberts & Hubel, 1999). Segundo Oggé et al. (2010), a placentação anormal, descrita na pré-eclâmpsia, desempenha importante papel na ativação da resposta inflamatória sistêmica intra-vascular materna, devido a liberação de fatores solúveis na circulação materna, como citocinas inflamatórias (Munno et al., 1999), fatores anti-angiogênicos (Karumanchi & Bdolah, 2004; Kita & Mitsuhita, 2008) e radicais livres (Many et al., 2000) ou partículas do sinciciotrofoblasto (Redman & Sargent, 2007).

Segundo a literatura, a pré-eclâmpsia representa o desbalanço entre atividade oxidante e anti-oxidante (Kumar & Das, 2002), favorecendo a superprodução de espécies reativas do oxigênio (Bilodeau & Hubel, 2003),

característica do estresse oxidativo, que poderia afetar a atividade funcional dos monócitos. Radicais livres podem ser gerados de muitos elementos, mas no sistema biológico, são mais importantes aqueles envolvendo oxigênio e nitrogênio. Sob condições fisiológicas, o radical livre de oxigênio mais comum é o ânion superóxido (O_2^-) (Burton & Jauniaux et al., 2011).

Peraçoli et al. (2011) verificaram que monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia encontram-se ativados endogenamente, produzindo maiores concentrações de ânion superóxido (O_2^-), de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) em comparação com gestantes normais. Esses resultados sugerem que a pré-eclâmpsia é caracterizada por estresse oxidativo e que os monócitos maternos circulantes podem representar importante fonte de citocinas inflamatórias durante a doença.

Portanto, os dados da literatura indicam ser a pré-eclâmpsia uma patologia que se acompanha de resposta inflamatória materna intensa, representada por ativação de células inflamatórias como monócitos e granulócitos, bem como ativação de células endoteliais, integrantes do sistema inflamatório (Haeger et al., 1996; Sacks et al., 1998; Redman et al., 1999; Dusse et al., 2011). Portanto, a ativação do sistema imune inato pode causar problemas no processo de evolução normal da gestação. O significado dessas alterações imunológicas na patogênese da pré-eclâmpsia é ainda desconhecido.

Dados recentes da literatura sugerem que células da linhagem monocítica-macrofágica, representantes da imunidade inata, são populações celulares que se adaptam e respondem a grande variedade de sinais presentes no ambiente onde se encontram. O estado de ativação e funções dessas células são marcadamente afetados por diferentes citocinas e produtos microbianos, promovendo a orientação da resposta imune adaptativa para perfil Th1 ou Th2, bem como pela expressão de funções efetoras especializadas e polarizadas (Mantovani et al., 2002; Gordon, 2003; Mosser, 2003). Assim, a presença de monócitos e macrófagos em ambiente celular com predomínio de citocinas como IL-12, IL-18 e IFN-γ favorece a diferenciação de células Th1, que secretam TNF-α, IL-2 e IFN-γ, promovendo ativação de outras células como macrófagos e linfócitos T citotóxicos. Por outro lado, um ambiente onde predominam IL-10 e

IL-4 promove a geração de linfócitos Th2. Citocinas Th1 inibem a resposta Th2 e vice-versa. (Laresgoiti-Servitje et al., 2010).

Interferon-gama (IFN-γ), atuando isoladamente ou em associação com lipopolissacáriede (LPS) de microrganismos ou com TNF-α, ativa macrófagos (Hamilton, 2002) e monócitos (Calvi et al., 2003). A ativação dessas células é caracterizada pela sua maior capacidade de produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio, de citocinas inflamatórias como TNF-α, IL-12 e IL-23 (Verreck et al., 2004) e indução de resposta Th1 polarizada, sendo considerados como macrófagos M1 em comparação com a subpopulação celular Th1. O padrão de ativação M1 está associado com destruição tecidual e inflamação, sendo responsável pela produção de citocinas inflamatórias, além do aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (Mandal et al., 2011). IFNγ induz macrófagos M1 a desenvolver esta intensa resposta inflamatória (Martinez, 2011).

Por outro lado, macrófagos expostos a IL-10, glicocorticoides ou vitamina D3 são denominados M2 ou “alternativamente ativados” (Goerdt et al., 1999) e estão envolvidos na fagocitose, exercendo papel imunorregulador e de reparo tecidual (Vandooren et al., 2009). Portanto, macrófagos M2 diminuem o processo inflamatório através da produção de fatores antiinflamatórios como IL-10 e TGF-β e estimulam a expressão de receptores de manose (MMR) (Mandal et al., 2011). Segundo Mantovani et al. (2004), a classificação de macrófagos em subpopulações M1 e M2 refere-se, portanto, a dois extremos de um espectro de ativação dessas células.

Essas células polarizadas diferem entre si pela expressão de receptores, produção de citocinas e funções efetoras. Macrófagos M1 ativados por INF-γ ou LPS expressam receptores opsonínicos do tipo FcγRI, RII ou RIII (CD16, CD32, CD64), receptores TLR2 e TLR4 e citocinas inflamatórias TNF-α IL-1β, IL-6, IL-12 e IL-23, além de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (Mantovani et al., 2004). Por outro lado, a ativação por IL-4 e IL-13 polariza para o perfil M2, caracterizado por maior expressão de receptores CD163 “scavenger” para hemoglobina (Kristiansen et al. 2001) que também possui propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias (Zuwala-Jagiello, 2006), de receptor de

manose (CD206), além de maior produção de IL-10 e TGF-β1 (Mantovani et al., 2004).

Assim, macrófagos são células com plasticidade porque podem mudar de um estado ativado M1 para M2 ou regulador e vice-versa, sob efeito de sinais específicos do ambiente onde se encontram (Porcheray et al., 2005; Bouhel et al., 2007).

Um dos principais problemas observados no início do desenvolvimento da pré-eclâmpsia é a alteração da regulação do sistema imunológico, não acontecendo a polarização para o perfil de citocinas Th2, observado em gestantes normais (Laresgoiti-Servitje et al., 2010).

A classificação de macrófagos em subpopulações M1 e M2 pode ser estendida para estudos empregando monócitos do sangue periférico humano em diferentes patologias como sepse (Groselj-Grenc et al., 2008), infecções (Babu et al., 2009), diabetes tipo 2 (Satoh et al., 2010) e estudos utilizando agentes moduladores da resposta inflamatória para tratamento in vitro dessas células (Lovren et al., 2010; Pena et al., 2011). Assim, Babu et al. (2009) mostraram que monócitos de pacientes com infecção por filaria apresentam fenótipo M2, com função imunorregulatória, produzindo níveis elevados de IL-10 e TGF-β e reduzidos de IL-12 e IL-18, podendo ter papel importante na tolerância antígeno-específica detectada na filariose.

Groselj-Grenc et al. (2008) A expressão de CD64 e CD163 na superfície de neutrófilos e monócitos foi avaliada em neonatos e crianças com síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), associada ou não à sepse. A intesidade de expressão de CD64 na superfície de neutrófilos foi significativamente maior em pacientes com SIRS associada à sepse. Segundo os autores, a avaliação desses marcadores em monócitos e neutrófilos pode discriminar entre SIRS e sepse.

A menor produção de IL-10 e a expressão reduzida de CD163 em monócitos de pacientes diabéticos obesos trouxe evidências de que um desbalanço no fenótipo M1/M2 dessas células está associado com distúrbio metabólico no diabetes tipo 2 (Satoh et al., 2010).

Do mesmo modo, considerando-se que na pré-eclâmpsia os monócitos do sangue periférico se encontram ativados, produzindo citocinas inflamatórias (Peraçoli et al., 2007; 2011), a caracterização de subpopulações de monócitos

M1 e M2 nessas pacientes poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dessa doença.

Células do sistema imune inato expressam receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que estão envolvidos na resposta inflamatória de monócitos e são considerados componentes centrais do sistema imune inato (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Entre os vários PRRs a principal família é denominada 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). Uma família de receptores TLR foi descrita em mamíferos (Medzhitov & Janeway, 1997), havendo até o momento pelo menos 11 TLRs identificados em humanos e 13 em camundongos (Hurts & von Landenberg, 2008). Esses receptores podem ser classificados em intra e extracelulares, de acordo com sua localização na célula: TLR-1/2/4/6/10 são expressos na superfície celular, enquanto TLR-3/7/8/9 são expressos em compartimentos endossomais intracelulares (Krutzik et al., 2003; Abbas et al., 2008). Estão presentes em várias células, predominantemente nas do sistema imune inato, como monócitos, macrófagos, granulócitos e células dendríticas (Rehli, 2002).

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” (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).

A expressão de receptores TLR é descrita em tecidos presentes na interface materno-fetal, particularmente em células de Hofbauer, um tipo de macrófago presente nos vilos placentários (Kumazaki et al., 2004), em células trofoblásticas (Mitsunari et al., 2006), células endoteliais e fibroblastos da placenta (Ma et al., 2007). Segundo Koga & Mor (2008) esses dados sugerem

que não apenas células imunes, mas também outros tipos celulares da placenta possuem capacidade de responder a patógenos invasores, desempenhando papel fisológico protetor na placenta.

Kim et al. (2005) demonstraram que a expressão de TLR4 está aumentada em células trofoblásticas de pacientes com pré-eclâmpsia, sendo induzida por estímulo in vitro com LPS e TNF-α. Além disso, observaram co-localização de TLR4 e TNF-α em células trofoblásticas no leito placentário dessas pacientes. Segundo os autores, os “sinais de perigo” reconhecidos por esses receptores na interface materno-fetal podem desencadear um ambiente de citocinas desfavorável à gestação, sugerindo ser este um novo mecanismo que desencadearia a ativação do sistema imune inato na pré-eclâmpsia.

Evidências de que infecções possam ter papel etiológico na pré-eclâmpsia ainda não foram documentadas, embora baixas doses de LPS administradas a ratas, durante a gestação, podem induzir pré-eclâmpsia experimental (Faas et al., 1994). Além disso, detecta-se elevada produção de TNF-α na circulação e em cultura de monócitos isolados de pacientes com pré-eclâmpsia (Beckmann et al., 2004; Peraçoli et al., 2007). Esses resultados corroboram o envolvimento do sistema imune inato na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Litchtman AH, Pilai S. Imunologia celular e molecular, 6ª ed, Rio de Janeiro – RJ: Elsevier Editora Ltda, 2008. P. 267-301.

ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin no. 33. Washington, DC. 2002; 77:67–75.

Babu S, Kumaraswami V, Nutman TB. Alternatively activated and immunoregulatory monocytes in human filarial infections. J Infect Dis 2009; 199(12):1827-37.

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.

Bilodeau JF, Hubel CA. Current concepts in the use of antioxidants for treatment of preeclampsia. J Obstet Gynaecol Can 2003; 25(9):742-50.

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

Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. Cell Metab. 2007; 6(2):137-43.

Boulanger H, Flamant M. New insights in the pathophysiology of preeclampsia and potential therapeutic implications. Nephrol Ther. 2007; 3(7):437-48.

Burton GJ, Hung TH. Hypoxia-reoxygenation: a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. Fetal Mat Med Rev 2003; 14:97-117.

Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. J Soc Gynecol Investig. 2004; 11(6):342-52.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2011; 25(3):287-99.

Calvi SA, Peraçoli MTS, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, Soares AMVC. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect 2003; 5(2):107-13.

Dekker GA, Sibai BM. The immunology of preeclampsia. Semin Perinatol. 1999; 23(1):24-33.

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

Dusse LM, Rios DRA, Pinheiro MB, Cooper AJ, Lwaleed BA. Pre-eclampsia: relationship between coagulation, fibrinolysis and inflammation. Clin Chim acta. 2011; 412(1-2):17-21.

Elsheikh A, Creatsas G, Mastorakos G, Milingos S, Loutradis D, Michalas S. The renin-aldosterone system during normal and hypertensive pregnancy. Arch Gynecol Obstet. 2001; 264(4):182-5.

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; i:554-5.

Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Visscher CA, Bakker WW. A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. Am J Obstet Gynecol. 1994; 171(1):158-64.

Goerdt S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodelja V, Orfanos CE. Alternative versus classical activation of macrophages. Pathobiology. 1999; 67(5-6):222-6.

Gordon S. Alternatively activation of macrophages. Nat Rev Immunol 2003; 3(1):23-35.

Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. Mediators Inflammation 2008; doi: 10.1155/2008/202646.

Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. Obstet Gynecol Surv. 2005; 60(12):807-16.

Haeger M, Unander M, Andersson B, Tarkowski A, Arnestad JP, Bengtssom A. Increased release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in women with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Acta Obstet Gynecol Scand 1996; 75(8):695-701.

Hamilton TA. Molecular basis of macrophage activation: from gene expression to phenotypic diversity. In The macrophage (Bourke B and Lewis C, eds), Oxford University Press, Oxford 2002; pp 73-102.

Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. Hypertension. 2008; 51(4):970-5.

Hurst J, von Landenberg P. Toll-like receptors and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2008; 7(3):204-8.

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(7):836-9.

Karumanchi SA, Bdolah Y. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the "chicken-and-egg" question. Endocrinology. 2004; 145(11):4835-7.

Khan F, Belch JJ, MacLeod M, Mires G. Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops. Hypertension. 2005; 46(5):1123-8.

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.

Kita N, Mitsushita J. A possible placental factor for preeclampsia: sFlt-1. Curr Med Chem. 2008; 15(7):711-5.

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

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature 2001; 409(6817):198-201.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea

TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. Nat Med. 2003; 9(5):525-32.

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.

Kumar CA, Das UN. Oxidant stress in pre-eclampsia and essential hypertension. J Assoc Physicians India. 2002; 50:1372-5.

Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. Hum Pathol. 2004; 35(1):47-54.

Laresgoiti-Servitje E, Gómez-López N, Olson DM. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. Human reprod. 2010; 16(5):510-24.

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. N Engl J Med. 2006; 355(10):992-1005.

Lovren F, Pan Y, Quan A, Szmitko PE, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, Chan L, Al-Omran M, Teoh H, Verma S. Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010; 299(3):H656-63.

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

Magalhães CG, Borges VTM, Zanati SG, Abbade JF, matsubara BB, Peracoli JC. The heart as a target organ in preeclampsia. Hypertens Pregnancy. 2008; 27:528.

Ma Y; Krikun G; Abrahams VM; Mor G; Guller S. Cell type-specific expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. Placenta. 2007; 28(10):1024-31.

Mandal P, Pratt BT, Barnes M, McMullen MR, Nagy LE. Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. J Biol Chem. 2011; 286(15):13460-9.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A.Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol. 2002; 23(11):549-55.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 2004; 25(12):677-86.

Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia.Am J Pathol. 2000; 156(1):321-31.

Martinez FO. Regulators of macrophage activation. Eur J Immunol. 2011; 41(6):1531-4.

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.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell. 1997; 91(3):295-8.

Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T, Tsukihara S, Iwabe T, Harada T, Terakawa N. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. J Reprod Immunol. 2006; 72(1-2):46-59.

Moldenhauer JS, Stanek J, Warshak C, Khoury J, Sibai B. The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. Am J Obstet Gynecol. 2003; 189(4):1173-7.

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol 2003; 73(2):209-12.

Munno I, Chiechi LM, Lacedra G, Putignano G, Patimo C, Lobascio A, Loizzi P. Spontaneous and induced release of prostaglandins, interleukin (IL)-1beta, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha by placental tissue from normal and preeclamptic pregnancies. Am J Reprod Immunol. 1999; 42(6):369-74.

Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. Hypertens Pregnancy. 2000; 19(2):221-31.

Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. Histochem Cell Biol. 2004; 122(4):369-82.

Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2006; 195(1):40-9.

Oggé G, Romero R, Chaiworapongsa T, Gervasi MT, Pacora P, Erez O, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Gotsch F, Mittal P, Kim YM, Hassan SS.Leukocytes of pregnant women with small-for-gestational age neonates

have a different phenotypic and metabolic activity from those of women with preeclampsia. J Matern Fetal Neonatal Med. 2010; 23(6):476-87.

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.

Paternoster DM, Fantinato S, Manganelli F, Nicolini U, Milani M, Girolami A. Recent progress in the therapeutic management of pre-eclampsia. Expert Opin Pharmacother. 2004; 5(11):2233-9.

Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock RE. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. J Immunol. 2011; 186(12):7243-54.

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(3):177-85.

Peraçoli MT, Menegon FT, Borges VT, de Araújo Costa RA, Thomazini-Santos IA, Peraçoli JC. Platelet aggregation and TGF-beta (1) 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.

Perkins AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2006; 46(2):77-83.

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.

Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. Placenta. 1983; 4(4):397-413.

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. Clin Exp Immunol. 2005; 142(3):481-9.

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. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. Placenta. 2000; 21(7):597-602.

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.

Redman CW, Sargent IL. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. J Reprod Immunol. 2007; 76(1-2):61-7.

Redman CWG, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2010; 63(6):534-43.

Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. Trends Immunol. 2002; 23(8):375-8.

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

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

Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? Lancet. 1999; 354(9181):788-9.

Roberts JM, Redman CWG. Pre-eclampsia: More than pregnancy-induced hypertension. Lancet 1993; 341(8858):1447-51.

Robillard PY. Interest in preeclampsia for researchers in reproduction. J Reprod Immunol. 2002; 53(1-2):279-87.

Sacks GP, Studena K, Sargent IL, Redman CWG. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. Am J Obstet Gynecol 1998; 179(1):80-6.

Satoh N, Shimatsu A, Himeno A, Sasaki Y, Yamakage H, Yamada K, Suganami T, Ogawa Y. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. Diabetes Care. 2010; 33(1):e7.

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

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.

Tranquilli AL, Landi B. The origin of pre-eclampsia: from decidual "hyperoxia" to late hypoxia. Med Hypotheses. 2010; 75(1):38-46.

Valensise H, Novelli GP, Vasapollo B, Di Ruzza G, Romanini ME, Marchei M, Larciprete G, Manfellotto D, Romanini C, Galante A. Maternal diastolic dysfunction and left ventricular geometry in gestational hypertension. Hypertension. 2001; 37(5):1209-15.

Valensise H, Vasapollo B, Novelli GP, Laciprete G, Romanini C. Maternal diastolic function in asymptomatic pregnant women with bilateral notching of the uterine artery waveform at 24 week's gestation: a pilot study. Ultrasound Obstet Gynecol. 2001a; 18(5):450-5.

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.

Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, Yeremenko N, Boumans M, Lutter R, Tak PP, Baeten D. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. Arthritis Rheum 2009; 60(4):966-75.

Vázquez Blanco M, Grosso O, Bellido CA, Iavicoli OR, Berensztein CS, Ruda Veja H, Lerman J. Left ventricular geometry in pregnancy-induced hypertension. Am J Hypertens. 2000; 13:226-30.

Vázquez Blanco M, Rosinbilt J, Grosso O, Rodriguez G, Robert S, Berensztein CS, Vega HR, Lerman J. Left ventricular function impairment in pregnancy-induced hypertension. Am J Hypertens. 2001; 14(3):271-5.

Vázquez Blanco M, Grosso O, Belido CA, Iavicoli OR, Berensztein CS, Ruda Veja H. Dimensions of the left ventricle, atrium and aortic root in pregnancy-induced hypertension. Am J Hypertens. 2001a; 14(4 Pt 1):390-92.

Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to mycobacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(13):4560-5.

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.

von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. Hypertens Pregnancy. 2003; 22(2):143-8.

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

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? Immunol Today. 1993; 14(7):353-6.

Zuwala-Jagiello J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. Acta Biochim Pol 2006; 53(2):257-68.

CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS M1 E M2 E ASSOCIAÇÃO COM PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPSIA

M1 monocyte subpopulation is associated with pro-inflammatory cytokine production in pregnant women with preeclampsia

Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros[1]; Camila Ferreira Bannwart-Castro[1]; Mariana Romão[1]; Ingrid Cristina Weel[1]; Vera Therezinha Medeiros Borges[1]; Marjorie Assis Golim[2]; José Carlos Peraçoli [1]; Maria Terezinha Serrão Peraçoli [3]

[1] Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina- UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CEP 18618-970

[2] Divisão Hemocentro - Faculdade de Medicina- UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CEP 18618-970

[3]Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil , CEP 18618-970

RESUMO

Introdução e objetivos: Monócitos do sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia encontram-se ativados endogenamente e secretam níveis elevados de radicais livres e citocinas inflamatórias. Este trabalho teve como objetivo avaliar se o estado inflamatório de monócitos, observado na pré-eclâmpsia, está associado à polarização da subpopulação de monócitos de perfil M1 no sangue periférico, correlacionando a expressão de receptores de superfície CD64, TLR2, TLR4, CD163 e CD206 com a produção de citocinas; **Métodos**: Foram estudadas 90 gestantes, sendo 30 normotensas e 60 portadoras de pré-eclâmpsia, pareadas pela idade gestacional. Monócitos de sangue periférico obtidos de gestantes normais ou com pré-eclâmpsia foram cultivados por 18h na ausência ou presença de lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS) ou de peptidoglicano (PG) de bactéria Gram-positiva. A expressão de receptores presentes na superfície da subpopulação de monócitos inflamatórios M1 (TLR2, TLR4 e CD64) e de monócitos supressores M2 (CD163 e CD206) foi detectada por de citometria de fluxo, empregando-se anticorpos monoclonais específicos, marcados com fluorocromos. Os resultados foram expressos como média da intensidade de fluorescência. Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias associadas a padrão M1 (TNF-α, IL-12p70 e IL-23) e anti-inflamatória, associada a perfil M2 (IL-10) foi avaliada no sobrenadante de cultura de monócitos pela técnica de ELISA. Os resultados foram analisados por testes não paramétricos, com nível de significância de 5%. **Resultados:** A expressão de CD64 e TLR4 em monócitos, não estimulados, de gestantes com pré-eclâmpsia foi significativamente maior, enquanto a expressão de CD163 e CD206 foi significativamente menor em relação às gestantes normotensas, sugerindo a expressão de um perfil M1 de monócitos. A produção endógena de TNF-α, IL-12p70 e IL-23 por monócitos foi estatisticamente maior, enquanto a síntese de IL-10 foi menor nas gestantes com pré-eclâmpsia comparadas às gestantes normais. Após estímulo com LPS e PG observou-se produção elevada de IL-12p70 e IL-23 nos dois grupos de gestantes, porém os níveis produzidos pelas células das gestantes com pré-eclâmpsia foram significativamente maiores. Ao contrário, a liberação de TNF-α por monócitos das gestantes pré-eclâmpticas foi significativamente reduzida

em comparação às gestantes normotensas, sugerindo tolerância aos estímulos in vitro com LPS e PG. Os resultados confirmam o estado ativado dos monócitos em gestantes com pré-eclâmpsia pela produção elevada de citocinas pró-inflamatórias e pela expressão de receptores característicos da subpopulação M1. **Conclusão:** O presente estudo traz evidências de que monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia estão classicamente ativados e o ambiente inflamatório sistêmico pode diferenciar e polarizar essas células para o perfil M1.

Palavras chave: pré-eclâmpsia, subpopulações de monócitos, receptores TLR, citocinas

ABSTRACT

Introduction and objectives: Monocytes from peripheral blood of pregnant women with preeclampsia are endogenously activated and secrete high levels of free radicals and inflammatory cytokines. This work aimed to evaluate whether the inflammatory state of monocytes observed in preeclampsia is associated with the polarization of monocyte to M1 profile in peripheral blood, correlating the expression of surface receptors CD64, TLR2, TLR4, and CD163 and CD206 with cytokine production. **Methods:** We studied 90 pregnant women, 30 normotensive and 60 with preeclampsia, matched for gestational age. Peripheral blood monocytes obtained from normotensive pregnant or preeclamptic pregnant women were cultured for 18h in the absence or presence of *Escherichia coli* lypopolysacharide (LPS) or peptidoglycan (PG) of Gram-positive bacteria, and the expression of surface receptors on M1 inflammatory monocyte subpopulation (TLR2, TLR4 and CD64) and M2 suppressor monocyte subpopulation (CD163 and CD206) were evaluated by flow cytometry, using specific monoclonal antibodies, labeled with fluorochromes. The values were expressed as the mean fluorescence intensity. Moreover, the production of proinflammatory cytokines associated with M1 profile (TNF-α, IL-12p70 and IL-23) and the anti-inflammatory cytokine associated with M2 profile (IL-10) were evaluated in the monocyte supernatant of culture by enzyme immunoassay. Results were analyzed using nonparametric tests with significance level set at 5%. **Results:** The expression of CD4 and TLR4 on non-stimulated monocytes, from women with preeclampsia was significantly higher, while the expression of CD163 and CD206 was significantly decreased compared with normotensive pregnant women, suggesting the predominance of monocyte M1 profile. Endogenous production of TNF-α, IL-12p70 and IL-23 by monocytes was increased, while synthesis of IL-10 was lower in women with preeclampsia compared with normotensive pregnant women. After stimulation with LPS or PG it was observed high production of IL-12p70 and IL-23 in both groups of pregnant women. However, the levels produced by cells of preeclamptic pregnant women were significantly higher. On the other hand, TNF-α released by monocytes from women with preeclampsia was significantly reduced compared to normotensive pregnant women, suggesting tolerance to in

vitro stimulation with LPS and PG. The results confirm the activated state of monocytes from women with preeclampsia by increased production of proinflammatory cytokines and the expression of receptors characteristic of the M1 subpopulation. **Conclusion:** This study provides evidence that monocytes from women with preeclampsia are classically activated and the systemic inflammatory environment may differentiate and polarize these cells to the M1 profile.

Keywords: preeclampsia, monocyte subpopulation, TLR receptors, cytokines

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação humana, caracterizada por hipertensão arterial e proteinuria que se manifestam após a 20ª. semana de gestação (ACOG, 2002). É considerada uma doença cuja fisiopatologia ainda está em discussão, surgindo constantemente novos conceitos para seu entendimento, em decorrência do reconhecimento da natureza heterogênea dessa síndrome. Embora a fisiopatologia da PE seja centrada na lesão endotelial e na inadequada invasão citotrofoblástica endovascular (Dekker & Sibai, 1999), mulheres com PE apresentam largo espectro de manifestações clínicas, sendo altamente variáveis o grau de hipertensão arterial, o valor da proteinuria e a presença ou ausência de alterações laboratoriais, além de ser imprevisível o momento de seu aparecimento (Sibai et al., 2005; Borzychowski et al., 2006).

Apesar dos progressos recentes direcionados à compreensão da causa da PE, a etiologia desta doença permanece não esclarecida (Xie et al., 2010a). Entretanto, algumas teorias que procuram explicar essa etiologia incluem placentação anormal, má-adaptação cardiovascular à gestação, mecanismos genéticos e imunológicos e, a participação da resposta inflamatória sistêmica e de fatores angiogênicos elevados, demonstrando que multiplos fatores estão envolvidos (Goswami et al., 2006; Xie et al., 2010a).

Dados epidemiológicos apóiam a hipótese de uma etiologia da PE fundamentada em aspectos genéticos e imunológicos (Zhang et al., 1997). Segundo Uzan et al. (2011), as teorias genética (Sibai et al., 2005; Mutze et al., 2008) e imunológica (Colbern et al., 1994; Genbacev et al., 1999) estão interligadas. Alguns genes interagem nos sistemas hemostático e cardiovascular, bem como na resposta inflamatória (Mutze et al., 2008). A literatura sugere que a PE está relacionada com uma herança poligênica multifatorial (Carreiras et al., 2002; Trogstad et al., 2004). Portanto, a PE representa um distúrbio genético complexo, ocorrendo como resultado de numerosas variantes comuns a diferentes loci, que individualmente, exercem pouco efeito, mas em conjunto contribuem para a suscetibilidade individual à doença (Williams & Pipkin, 2011).

Embora a placenta desempenhe papel crucial no desenvolvimento da PE, atualmente considera-se que a inflamação e mecanismos imunes, ativados por

agentes infecciosos e mesmo por fatores endógenos derivados do hospedeiro podem ser importantes na patogênese da doença (Xie et al., 2010a).

Segundo Redman et al. (1999), a gestação normal é caracterizada por um aumento fisiológico na inflamação sistêmica e, que as alterações inflamatórias leves, resultantes da ativação da imunidade inata, não indicam doença, mas protegem o organismo materno contra infecções. Na PE essa reação inflamatória sistêmica é semelhante à observada na gestação normal, porém de maior intensidade (Redman et al., 1999; Redman & Sargent, 2005; Brewster et al., 2008). Portanto, essa doença seria resultante de ativação exacerbada da resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias, como monócitos e granulócitos, bem como células endoteliais que são parte do sistema inflamatório (Oian et al., 1985; Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006) Assim, haveria uma 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 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). Concentrações elevadas de IL-1 β, IL-6 e de quimiocinas IL-8, CXCL10/IP-10 e MCP-1 também estão presentes na PE em comparação com gestantes normais (Gotsch et al., 2007; Szarka et al., 2010; Kalinderis et al., 2011; De Oliveira et., 2011). Foi observado que produção anormal de citocinas e o distúrbio no balanço entre citocinas pro-inflamatórias (TNF-α, IL-12, IFN-γ, IL-2) e antiflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13) está envolvido no dano vascular e na PE (Sharma et al., 2010).

Segundo Steegers et al. (2010), a resposta inflamatória sistêmica exagerada da PE determina disfunção endotelial (Redman & Sargent, 2009), que juntamente com o aumento da resistência vascular, precedem as manifestações clínicas da doença (Myers et al., 2005).

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. Recentemente, Peraçoli et al. (2011) relataram a ativação endógena de monócitos de gestantes portadoras de PE, demonstrando a produção elevada

de anion 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.

Monócitos são células pertencentes à linhagem monocítica-macrofágica, consideradas populações celulares que se adaptam e respondem a uma grande variedade de sinais presentes no ambiente onde se encontram. O estado de ativação e funções dessas células são marcadamente afetados por diferentes citocinas e produtos microbianos, promovendo a orientação da resposta imune adaptativa para perfil Th1 ou Th2, bem como pela expressão de funções efetoras especializadas e polarizadas (Gordon, 2003; Mosser, 2003; Mantovani et al., 2002). Assim, macrófagos podem ser classificados em pelo menos duas subpopulações com distintos fenótipos, ou seja, classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2) de acordo com suas funções (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008; Gordon & Martinez, 2010).

Segundo Mantovani et al. (2004), a classificação M1 e M2 refere-se a dois extremos de um espectro de ativação de macrófagos. Essas células polarizadas diferem entre si pela expressão de receptores, produção de citocinas e funções efetoras. Macrófagos M1 ativados por INF-γ, TNF-α ou LPS expressam receptores opsonínicos do tipo FcγRI, RII ou RIII (CD16, CD32, CD64), receptores TLR2 e TLR4 e citocinas inflamatórias TNF-α IL-1β, IL-6, IL-12 e IL-23, além de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (Mantovani et al., 2004; Sica et al., 2008). Por outro lado, a ativação por IL-4 e IL-13 polariza para o perfil M2, caracterizado por maior expressão de receptores CD163 “scavenger” para hemoglobina (Kristiansen et al. 2001) que também possui propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias (Zuwala-Jagiello, 2006), de receptor de manose (CD206), além de maior produção de IL-10 e TGF-β1 (Mantovani et al., 2004).

Portanto, macrófagos são células com plasticidade, pois podem mudar de um estado ativado M1 para M2 ou regulador e vice-versa, sob efeito de sinais específicos do ambiente onde se encontram (Porcheray et al., 2005;

Bouhel et al., 2007).

Essa classificação M1 e M2, inicialmente proposta para macrófagos, pode se estendida para monócitos do sangue periférico humano em patologias como sepse (Groselj-Grenc et al., 2008), infecções (Babu et al., 2009), diabetes tipo 2 (Satoh et al., 2010) e estudos utilizando agentes moduladores da resposta inflamatória para tratamento in vitro dessas células (Lovren et al., 2010; Pena et al., 2011).

Considerando que na pré-eclâmpsia os monócitos do sangue periférico encontram-se ativados, produzindo citocinas inflamatórias (Peraçoli et al., 2007), a caracterização de subpopulações de monócitos M1 e M2 nessas pacientes poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na pré-eclâmpsia.

2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar se o estado inflamatório de monócitos, observado em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, está associado à polarização da subpopulação de monócitos de perfil M1 no sangue periférico.

2.2. Correlacionar a expressão de receptores de superfície CD64, TLR2, TLR4 (monócitos M1) e CD163 e CD206 (monócitos M2) com a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-12 e IL-23) e anti-inflamatória (IL-10) por monócitos do sangue periférico dessas gestantes.

3. CASUISTICA E MÉTODOS

3.1. Gestantes

Foram estudadas 30 primigestas normotensas (grupo controle) e 60 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (grupo estudo), pareadas pela idade gestacional e que realizaram a assistência ao parto na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

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

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

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. 365/2009-CEP (Anexo 1).

3.2. Critérios de Inclusão

Grupo controle: gestantes normotensas: ser primigesta, com gestação única, sem complicações clínicas ou obstétricas;

G*rupo estudo: gestantes portadoras de pré-eclâmpsia*: ser primigesta e portadora de pré-eclâmpsia, sem outras complicações clínicas ou obstétricas.

3.3. Critérios de Exclusão

Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de pré-eclâmpsia ou não ter a gestação resolvida no Serviço de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

3.4. Dosagem da Proteinúria

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

3.5. Colheita de Sangue das Gestantes

A colheita de sangue, para a avaliação da expressão de receptores e produção de citocinas por monócitos, de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia 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.

3.6. Isolamento e Cultura de Monócitos

Sangue periférico das gestantes foi colhido por punção venosa, sendo 20 mL colocados em tubo estéril contendo 10 U/mL de heparina (Liquemine, Roche). As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), segundo a técnica descrita por Bøyum (1968). O anel rico em células mononucleares foi lavado com meio de cultura RPMI por 10 min a 200g e logo após com o mesmo meio de cultura por mais 10 min a 200g. Após esses procedimentos as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL Life Technologies, Breda, The Netherlands) inativado (RPMI completo), sendo a identificação e a viabilidade dos monócitos estimadas por incorporação de vermelho neutro e exclusão por azul tripan 0,2%, respectivamente. Para isso, 50 µL da suspensão de células mononucleares foram incubados por 10 min a 37ºC com 450 µL da solução de vermelho neutro a 0,02%. Os monócitos foram diferenciados dos linfócitos por apresentarem citoplasma de coloração vermelha e a concentração celular foi ajustada para $5x10^5$ monócitos viáveis/mL, após contagem em câmara hemocitométrica. As células foram distribuídas em placas de cultura de 24 orifícios (Linbro, Flow Lab, USA) e incubadas por 60 min a 37ºC, em tensão de 5% de CO_2. As células não-aderentes foram eliminadas pela lavagem dos orifícios da placa com meio de cultura RPMI.

3.7. Obtenção de Sobrenadante de Cultura de Monócitos

Para a avaliação da produção de citocinas, os monócitos, obtidos conforme descrito no item 3.6., foram incubados a 37ºC, em tensão de 5% de CO_2 por 18h, na ausência ou presença de lipopolissacáride (LPS) de

Escherichia coli, $O_{55}B_5$ (Sigma) ou de Peptidoglicano (PG) de bactéria Gram-positiva (Sigma), ambos na concentraçâo de 1µg/mL. Essa concentração foi previamente padronizada em ensaios para avaliação da produção de citocinas empregando-se esses estímulos. O sobrenadante obtido após 18h de cultivo foi aspirado, centrifugado a 600g e distribuído em alíquotas, conservadas a -80ºC até o momento da dosagem das citocinas IL-10, IL-12p70, IL-23 e TNF-α pela técnica de Elisa.

3.8. Determinação das Citocinas pela Técnica de ELISA

Para quantificação das citocinas nos sobrenadantes de cultura de monócitos, tratados ou não com LPS ou PG foi empregado o ensaio imunoenzimático (ELISA) e kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). As reações foram desenvolvidas segundo as instruções dos fabricantes e descritas conforme a técnica abaixo.

Placas de 96 orifícios de fundo plano (MaxiSorp-Nunc Life Tech. Inc., Maryland, MA, USA) foram sensibilizadas por 18h a 5ºC com anticorpo monoclonal anti-citocina, diluído em PBS. Após esse período, os orifícios foram lavados quatro vezes com 300 µL de PBS, pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). Para o bloqueio da placa foi adicionado, em cada orifício, 300µL de PBS contendo soro albumina bovina (BSA) 1%, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 60 min. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100µL dos sobrenadantes gerados e das citocinas recombinantes (R&D Systems) adicionados aos orifícios das placas. Após 2h de incubação à temperatura ambiente e nova lavagem da placa, o anticorpo revelador policlonal anti-citocina (R&D Systems) foi adicionado, seguido de incubação por 2h à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionados 100µL de estreptoavidina conjugada com peroxidase (R&D Systems), na concentração de 2µg/mL por 20 min a 37ºC, seguido pela lavagem da placa com PBST. Após esse período, foram adicionados 100µL do substrato enzimático, constituído por 10 µL de H_2O_2 a 30% (Sigma), diluídos em 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH5,0 e 1mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min, a reação foi bloqueada pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Multiskan

EFLAB, Helsinki, Finland) com comprimento de onda de 492nm. As concentrações das citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura dos monócitos, tratados ou não com LPS e PG foram calculadas sobre curva padrão realizadas com as diferentes citocinas recombinantes humanas. Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonal e policlonal, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas padrão foram as recomendadas pelo fabricante (R&D Systems).

Para a dosagem de citocinas produzidas por monócitos, estimulados ou não com LPS e PG, foi inicialmente realizada a padronização do tempo de cultura e da concentração ideal de LPS e de PG a serem utilizadas para estímulo dos monócitos. Foram empregadas concentrações de LPS variando de 0,1 a 10 ug/mL e de PG variando de 0,1 a 5 ug/mL. A produção de TNF-α e IL-10 por monócitos de mulheres saudáveis, submetidos ä cultura com os diferentes estímulos nos períodos de 4h e 18h foi significativamente mais elevada em relação às culturas controle, não estimuladas. Os maiores níveis de TNF-α e IL-10 foram observados na concentração de 1 ug/mL de LPS, tanto no período de 4h como no período de 18h de cultivo. A concentração de 1 ug/mL de PG determinou a produção de níveis mais elevados de TNF-α no período de 18h de cultura. Os resultados obtidos após 18h de cultivo, tanto com LPS como com PG foram significativamente mais elevados do que os observados em 4h de estímulo. Em vista desses resultados, escolheram-se as concentrações de 1ug/mL de LPS e 1 ug/mL de PG e o tempo de 18h de cultivo para o estímulo de monócitos de gestantes normotensas e portadoras de PE para análise da produção de citocinas.

3.9. Expressão de TLR2, TLR4, CD64, CD163 e CD206 na Superfície de Monócitos

Células mononucleares do sangue periférico obtidas conforme descrito no item 3.6. foram incubadas a 37ºC, em tensão de 5% de CO_2, na ausência ou presença de lipopolissacáride (LPS) de *Escherichia coli*, $O_{55}B_5$ (Sigma) ou de peptidoglicano (PG) de bactéria Gram-positiva (Sigma) ambos na concentração de 1 µg/mL por 18h. A concentração celular, ajustada para $5x10^5$ monócitos viáveis/mL, foi distribuída em tubos Falcon para citômetro (BD Labware). As

células foram então incubadas com anticorpos anti-TLR4 conjugado com PE (Biolegend, Inc, San Diego, CA, USA), com anti-TLR2 conjugado com FITC (BioLegend), com anti-CD14 conjugado com PerCy7 (BioLegend), com anti-CD64 conjugado com FITC (BioLegend), anti-CD163 conjugado com PE (BioLegend) ou anti-CD206 conjugado com FITC (BioLegend) durante 20 min. Para cada teste, um tubo controle foi incubado com anticorpos controles isotípicos marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. As células foram centrifugadas por 10 min a 200g para lavagem e ressuspendidas em 500µL de ISOTON II, fixadas com 50 µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD Labware). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo modelo FACSCALIBUR^{TM} (Becton Dickinson) usando programa “Cell Quest” (Becton Dickson) para adquirir e analisar multiparâmetros celulares. Foi padronizada a aquisição de 20.000 eventos por amostra, sendo otimizada a população de interesse, estabelecendo-se *gate* (janela) com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) ou fluorescência (FL). A partir desse *gate*, foram selecionados monócitos positivos para CD14, e avaliada a média de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão de TLR2, TLR4, CD64, CD163 e CD206.

Para avaliar a expressão desses receptores de superfície de monócitos de gestantes com PE e gestantes normotensas foi padronizada a técnica de citometria de fluxo, empregando-se monócitos de mulheres saudáveis não grávidas. As concentrações dos anticorpos específicos, o número de células e o tempo de incubação foram padronizados seguindo-se as recomendações do fabricante (Biolegend, Inc, San Diego, CA, USA). Foram estabelecidas as concentrações de anticorpos que permitiram marcação nítida e sem reações inespecíficas. As diferentes concentrações de LPS (0,1 a 10 ug/mL) e PG (0,1 a 5 ug/mL) também foram testadas por citometria de fluxo para análise da viabilidade dos monócitos. Observou-se que, mesmo em altas concentrações como 10 ug/mL de LPS e 5 ug/mL de PG, a viabilidade celular não foi afetada.

3.10. Análise Estatística

Os resultados referentes à expressão dos receptores de superfície dos monócitos, bem como da produção de citocinas por essas células em gestantes normais e com pré-eclâmpsia foram analisados, empregando-se

análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis seguida do teste de comparações múltiplas de Dunn. Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego, CA, USA (2000), com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Características das gestantes

As características das gestantes estudadas, estratificadas em normotensas (GN) e portadoras de pré-eclâmpsia (PE) encontram-se na Tabela 1. A idade materna e a idade gestacional foram semelhantes entre os grupos analisados. As gestantes com pré-eclâmpsia apresentaram concentração de proteinúria variando de 300 mg a 20.160 mg/urina de 24 h.

Tabela 1. Características das gestantes estudadas.

	Grupos	
	GN	**PE**
Caracteristicas	**n = 30**	**n = 60**
Idade (anos)	**22 (15 – 40)**	**24 (14 – 43)**
Idade gestacional (semanas)	**34,5 (24 – 40)**	**35 (24 – 40)**
Proteinúria (mg/urina 24h)	**< 300**	**740 (300 – 20.160)**

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

4.2. Expressão de TLR2, TLR4, CD64, CD163 e CD206 na superfície de monócitos de gestantes normotensas e de portadoras de pré-eclâmpsia

A análise da expressão de TLR2 por monócitos de gestantes dos grupos PE e GN (Fig. 1A) mostra resultados semelhantes de expressão endógena desse receptor, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Resultados similares foram observados após estímulo das células com LPS. O estímulo com PG induziu aumento significativo na expressão de TLR2 nas células de gestantes normotensas, enquanto nas gestantes com pré-eclâmpsia esses níveis foram semelhantes aos das células não estimuladas.

Na avaliação de TLR4 observa-se expressão endógena significativamente maior em gestantes portadoras de PE em comparação com gestantes normais (Fig. 1B). O estímulo com LPS induziu maior expressão de TLR4 nas células de gestantes normotensas, mas não interferiu com os níveis desse marcador nas células de gestantes pré-eclâmpticas. Após cultura com PG, a expressão de TLR4 manteve-se semelhante à das células não estimuladas nos dois grupos, porém foi significativamente menor em comparação ao estímulo com LPS.

Ocorreu também aumento da expressão espontânea de CD64 nas células de gestantes com PE (Figura 1C). Porém, o estímulo com LPS ou PG não induziu aumento da expressão de CD64 pelos monócitos dessas pacientes. Ao contrário, nas gestantes normotensas observa-se aumento da intensidade de fluorescência expressa pelas células após estímulo com LPS e PG em relação às células controle. Esses resultados sugerem que as células das gestantes pré-eclâmpticas encontram-se ativadas in vivo e não respondem adequadamente à ativação in vitro por LPS e PG.

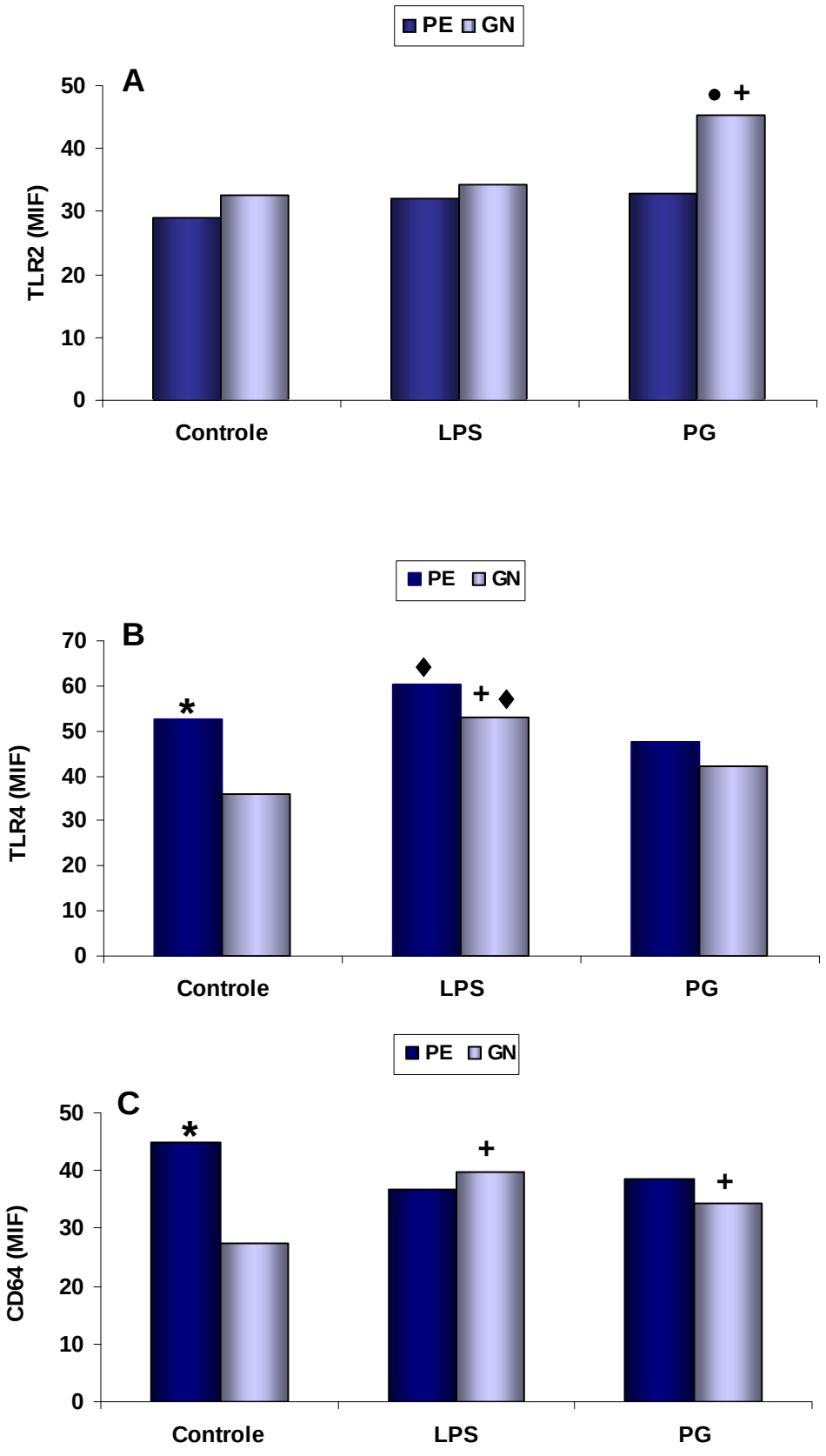


Figura 1. Expressão de TLR2 (A), TLR4 (B) e CD64 (C) por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e de gestantes normotensas (GN), cultivados por 18h na ausência (controle) ou presença de 1 ug/mL lipopolissacáride (LPS) ou 1 ug/mL peptidoglicano (PG). Valores expressos em mediana.

* ($p < 0,05$) vs GN; + ($p<0,05$) vs controle; ● ($p < 0,05$) vs PE; ♦ ($p< 0,05$) vs PG (teste de Kruskal-Wallis).

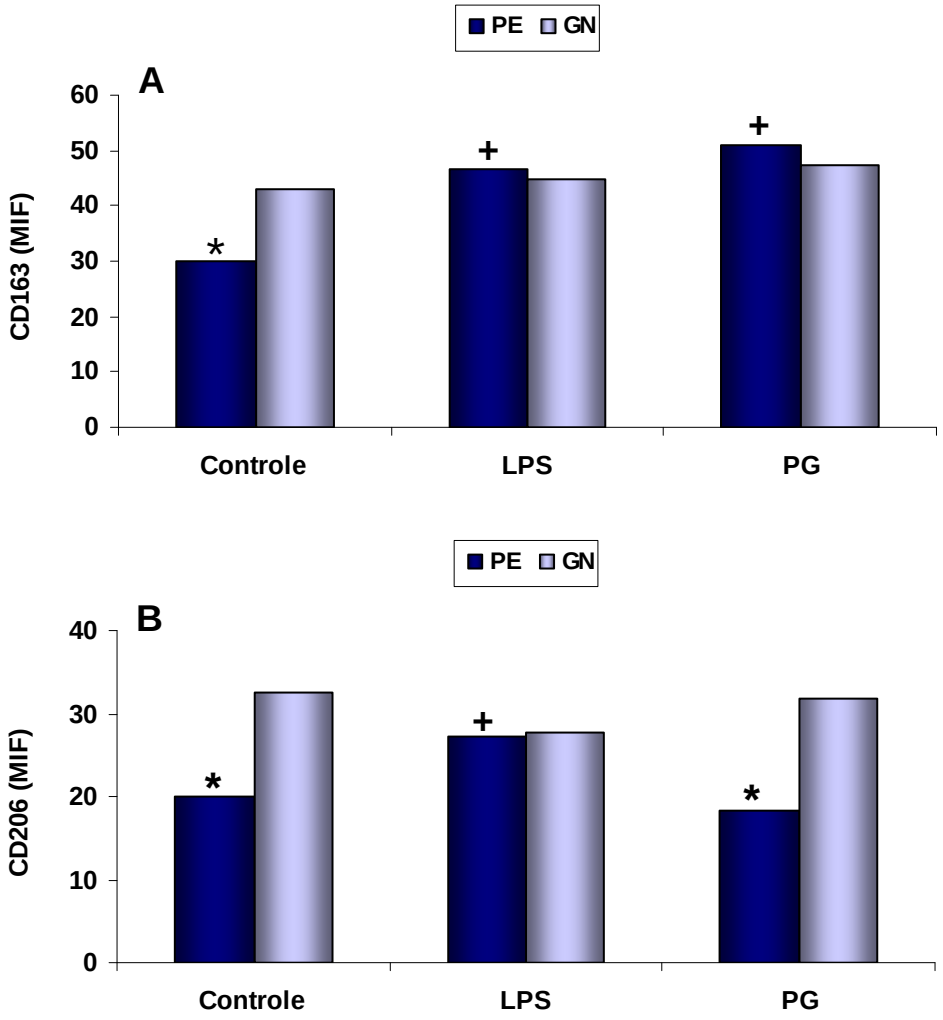


Figura 2. Expressão de CD163 (A) e CD206 (B) por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e de gestantes normotensas (GN), cultivados por 18h na ausência (controle) ou presença de 1 ug/mL lipopolissacáride (LPS) ou 1 ug/mL peptidoglicano (PG). Valores expressos em mediana.

* ($p<0,05$) vs GN; + ($p<0,05$) vs controle (teste de Kruskal-Wallis).

A expressão endógena de CD163 e de CD206, receptor de manose, foi significativamente menor nos monócitos de gestantes com PE em comparação com as gestantes normotensas (Figs. 2A e 2B). Quando as células foram estimuladas com LPS houve aumento significativo da expressão de marcadores CD163 e CD206 nas gestantes pré-eclâmpticas enquanto nas GN os valores se mantiveram ao nível da expressão endógena. O estímulo com PG não interferiu com a expressão de CD206 tanto nas gestantes GN como nas portadoras de PE.

4.3. Determinação de citocinas no sobrenadante de cultura de monócitos de gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia

4.3.1. Produção de TNF-α e IL-10

Os níveis de TNF-α produzidos por monócitos, não estimulados, foram significativamente maiores no grupo PE em relação ao GN (Fig. 3A), sugerindo ativação endógena dessas células. Quando as células foram estimuladas com LPS ou PG houve aumento significativo da produção de TNF-α nos dois grupos de gestantes. Porém, a concentração da citocina foi significativamente menor nas mulheres com PE em relação às GN.

A produção endógena de IL-10 por monócitos de gestantes com PE foi significativamente menor do que no grupo GN (Fig. 3B). A incubação dos monócitos com LPS ou PG estimulou a síntese dessa citocina pelas células dos dois grupos de gestantes, demonstrando a capacidade de produção de IL-10 por essas células.

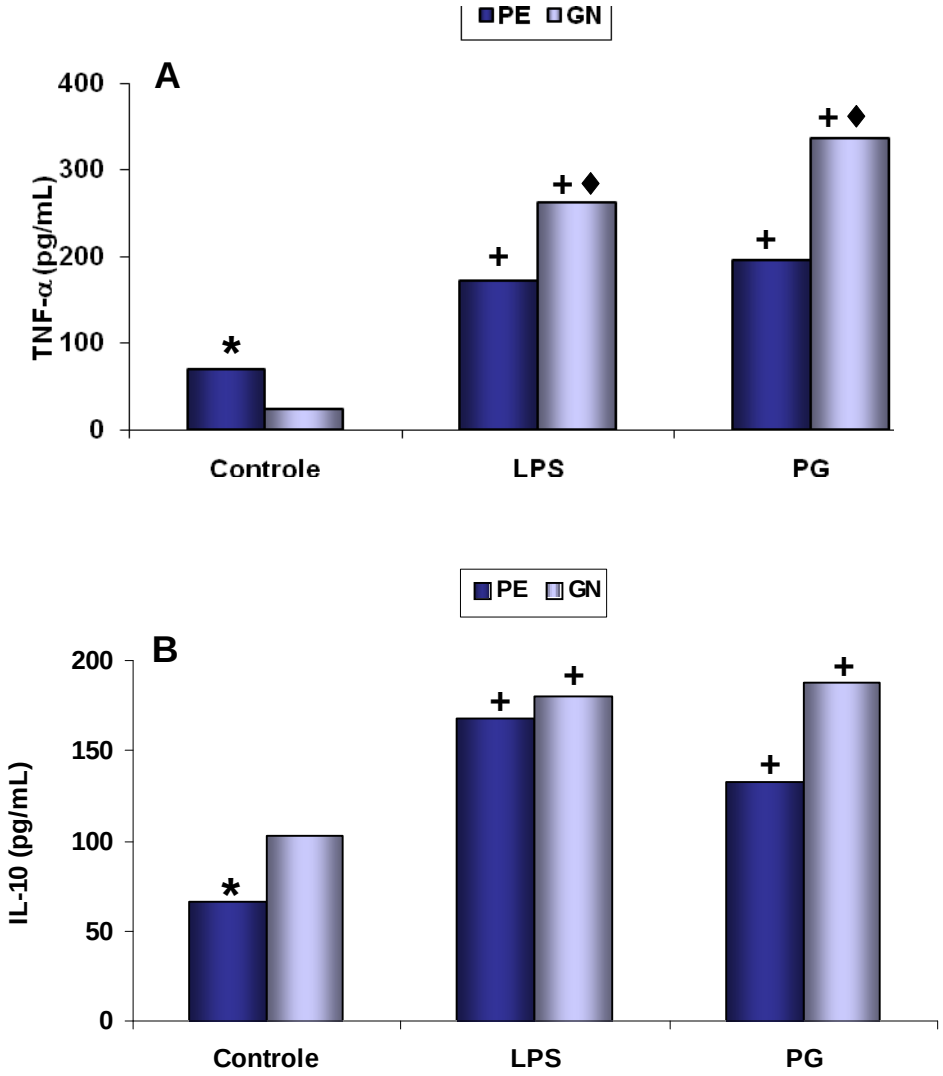


Figura 3. Produção de TNF-α (A) e IL-10 (B) por monócitos de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e de gestantes normotensas (GN) cultivados por 18h na ausência (controle) ou presença de 1 ug/mL lipopolissacáride (LPS) ou 1 ug/mL peptidoglicano (PG). Valores expressos em mediana.

* ($p<0,05$) vs GN; + ($p<0,05$) vs controle; ♦ ($p<0,05$) vs PE (teste de Kruskal-Wallis).

4.3.2. Produção de IL-12p70 e IL-23

A análise da produção de IL-12p70 mostra que, os níveis dessa citocina inflamatória, secretada pelos monócitos estimulados ou não com LPS e PG, foram significativamente maiores em gestantes com PE quando comparadas com GN (Fig. 4A). Essa elevada produção endógena da citocina pelos monócitos das gestantes pré-eclâmpticas sugere a ativação dessas células in

vivo. O estímulo das células dessas pacientes com LPS determinou o aparecimento de níveis mais elevados de IL-12p70 e semelhantes aos produzidos pelas células controle, não estimuladas, enquanto a cultura das células com PG induziu a produção de concentrações mais elevadas de IL-12p70 em comparação às células controle. No grupo de GN a produção estimulada com LPS ou PG foi significativamente maior do que nas culturas controle.

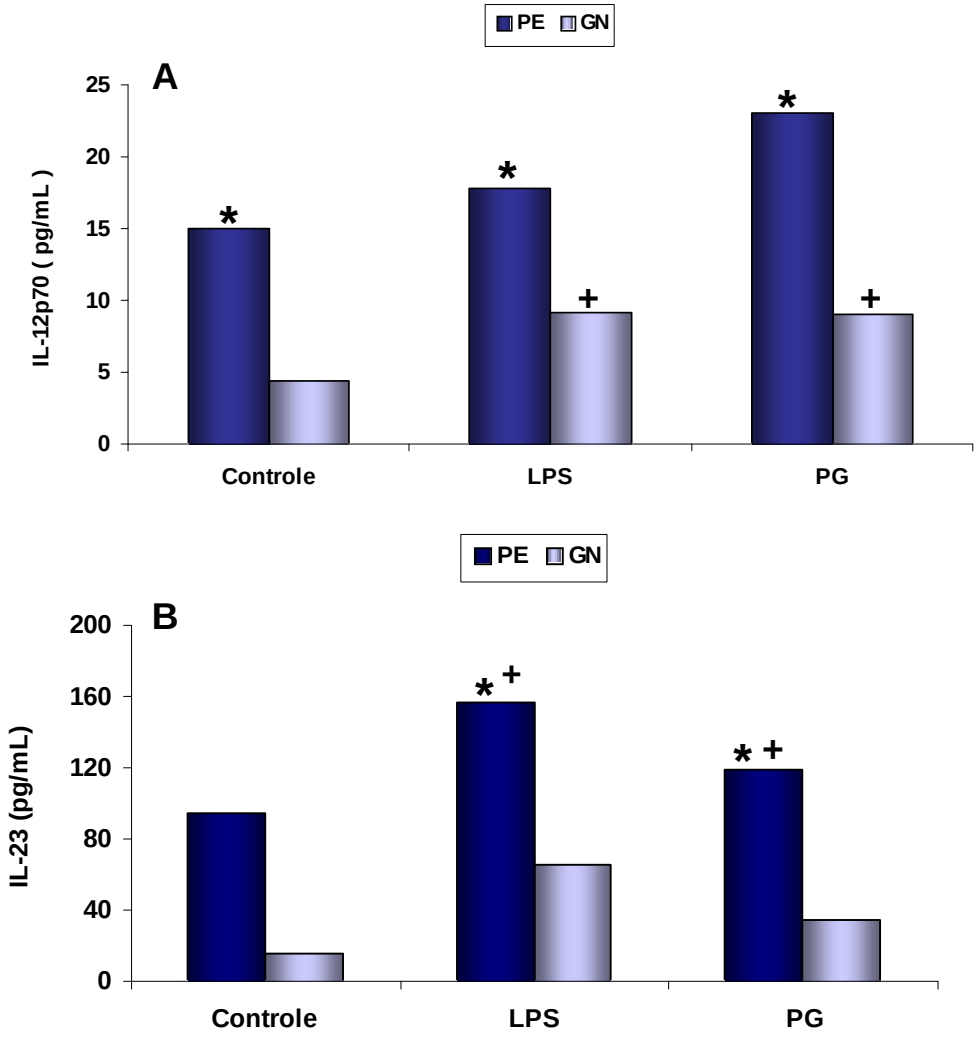


Figura 4. Produção de IL-12p70 (A) e IL-23 (B) por monócitos de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e de gestantes normotensas (GN) cultivados por 18h na ausência (controle) ou presença de 1 ug/mL lipopolissacáride (LPS) ou 1 ug/mL peptidoglicano (PG). Valores expressos em mediana.

* ($p<0,05$) vs GN; + ($p<0,05$) vs controle (teste de Kruskal-Wallis).

A comparação dos níveis de IL-23 produzidos pelos monócitos de gestantes com PE ou GN evidencia resultados semelhantes aos obtidos no estudo de IL-12p70. A produção da citocina, tanto endógena como estimulada por LPS ou PG pelas células das gestantes pré-eclâmpticas foi significativamente maior do que no grupo GN. A produção de IL-23, estimulada por LPS ou PG, foi significativamente mais elevada nos dois grupos de gestantes estudadas, em relação às culturas controle (Fig. 4B).

4.3.3. Correlação entre expressão de receptores de superfície de monócitos e produção de citocinas

A análise de correlação entre a expressão dos receptores TLR2, TLR4, CD64, CD163 e CD206 e a produção de TNF-α, IL-12p70, IL-23 e IL-10 está representada nos quadros 1, 2, 3, 4 e 5.

Nos quadros 1 e 2 estão expressos os coeficientes de correlação entre os receptores expressos na superfície de monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas, respectivamente.

Quadro 1. Correlação entre expressão endógena de receptores de superfície de monócitos em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

	TLR4	CD64	CD163	CD206
TLR2	**r = 0,4257** **p = 0,0108**	**r = 0,4279** **p = 0,0163**	r = 0,2684 p = 0,1375	**r = 0,3471** **p = 0,0411**
TLR4		**r = 0,5849** **p = 0,0011**	r = 0,1177 p = 0,5213	r = 0,3362 p = 0,1519
CD64			r = - 0,2280 p = 0,3337	r = 0,2787 p = 0,1978
CD163				**r = 0,5433** **p = 0,0013**

A análise dos monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia mostrou haver correlação positiva entre expressão de TLR2 e TLR4, TLR2 e CD64, TLR2 e CD206, entre TLR4 e CD64 e entre CD163 e CD206 (Quadro 1). Nas gestantes normotensas houve correlação entre TLR2 e CD64, TLR2 e CD163, TLR2 e CD206 e entre CD163 e CD206 (Quadro 2).

Quadro 2. Correlação entre expressão endógena de receptores de superfície de monócitos em gestantes normotensas.

	TLR4	**CD64**	**CD163**	**CD206**
TLR2	r = 0,3018 p = 0,0736	**r = 0,3965** **p = 0,0247**	**r = 0,4710** **p = 0,0057**	**r = 0,6201** **p = 0,0002**
TLR4		r = 0,1441 p = 0,4238	r = 0,3034 p = 0,1095	r = 0,2884 p = 0,1036
CD64			r = 0,1895 p = 0,3072	r = 0.3462 p = 0,1145
CD163				**r = 0,5057** **p = 0,0060**

Na avaliação das citocinas produzidas por gestantes portadoras de pré-eclâmpsia detectou-se correlação positiva entre os níveis endógenos de TNF-α e IL-12, entre TNF-α e IL-23 e entre IL-12p70 e IL-23 (Quadro 3). Entre as gestantes normotensas também se observou correlação positiva entre TNF-α e IL-10, entre TNF-α e IL-23 e entre IL-12p70 e IL-23 (Quadro 4).

Quadro 3. Correlação entre a produção endógena de citocinas por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

	IL-10	**IL-12p70**	**IL-23**
TNF-α	r = 0,2835 p = 0,3908	**r = 0,4114** **p = 0,0068**	**r = 0,4805** **p = 0,0020**
IL-10		r = 0,2734 p = 0,1066	r = - 0,2088 p = 0,2149
IL-12p70			**r = 0,6684** **p = 0,0001**

Quadro 4. Correlação entre a produção endógena de citocinas por monócitos de gestantes normotensas.

	IL-10	**IL-12p70**	**IL-23**
TNF-α	**r = 0,4090** **p = 0,0147**	r = 0,3098 p = 0,0793	**R = 0,4015** **p = 0,0206**
IL-10		r = 0,3073 p = 0,0820	r = - 0,3256 p = 0,0644
IL-12p70			**r = 0,3517** **p = 0,0414**

A análise da produção endógena de citocinas e da expressão de receptores de superfície por monócitos não estimulados em gestantes pré-eclâmpticas mostrou correlação positiva entre a expressão de TLR4 e os níveis

de TNF-α e de IL-23 (Quadro 5). Resultados semelhantes foram obtidos entre a expressão de CD64 e a produção dessas duas citocinas inflamatórias.

Quadro 5. Correlação entre a produção endógena de citocinas e a expressão de receptores de superfície por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

	TNF-α	**IL-10**	**IL-12p70**	**IL-23**
TLR2	r = - 0,1879 p = 0,6073	r = 0,3497 p = 0,2652	R = - 0,5532 p = 0,1049	r = - 0,6108 p = 0,1150
TLR4	**r = 0,5126** **p = 0,0354**	r = 0,2727 p = 0,4171	r = 0,4512 p = 0,1912	**r = 0,8095** **p = 0,0118**
CD64	**r = 0,7133** **p = 0,0092**	r = - 0,3095 p = 0,4618	r = 0,4681 p = 0,1786	**r = 0,6051** **p = 0,0371**
CD163	r = 0,5476 p = 0,1710	r = 0,2857 p = 0,5560	r = 0,2254 p = 0,4193	r = - 0,3591 p = 0,5167
CD206	r = 0,2517 p = 0,4299	r = 0,4909 p = 0,1548	r = 0,3748 p = 0,2300	r = - 0,2675 p = 0,4483

Nas gestantes normotensas a produção basal de TNF-α pelos monócitos correlacionou-se positivamente com a expressão de TLR4 e negativamente com a expressão de CD163 por essas células. Observou-se ainda correlação negativa entre expressão de CD64 e produção de IL-10 e, correlação positiva entre os níveis dessa citocina anti-inflamatória e a expressão de CD163 e CD206 (Quadro 6).

Quadro 6. Correlação entre a produção endógena de citocinas e a expressão de receptores de superfície por monócitos de gestantes normotensas.

	TNF-α	**IL-10**	**IL-12p70**	**IL-23**
TLR2	r = 0,3143 p = 0,2738	r = 0,2618 p = 0,3659	r = 0,2752 p = 0,3208	r = - 0,3894 p =0,1687
TLR4	**r = 0,5214** **p = 0,0362**	r = 0,2893 p = 0,2957	r = 0,2549 p = 0,3073	r = 0,3190 p = 0,2120
CD64	r = 0,3451 p = 0,2269	**r = - 0,6536** **p = 0,0082**	r = 0,2618 p = 0,3274	r = 0,3326 p = 0,2081
CD163	**r = - 0,6209** **p = 0,0235**	**r = 0,5941** **p = 0,0152**	r = 0,4637 p = 0,0949	r = 0,3699 p = 0,1584
CD206	r = 0,3287 p = 0,2969	**r = 0,6422** **p = 0,0054**	r = 0,3011 p = 0,2955	r = 0,3667 p = 0,1624

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho avaliamos a associação entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e receptores de superfície característicos de monócitos M1 e M2 em monócitos do sangue periférico de gestantes portadoras de PE. A expressão de CD64 e TLR4 em monócitos não estimulados e a produção endógena das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-12p70 e IL-23, características de monócitos M1, foram significativamente maiores nessas gestantes. Por outro lado, a expressão endógena de CD163 e CD206 e a produção de IL-10 (monócitos M2) pelos monócitos de gestantes pré-eclâmpticas foram significativamente menores em relação às gestantes normotensas. Esses resultados confirmam que monócitos de gestantes com PE encontram-se classicamente ativados e diferenciados para o fenótipo M1.

A expressão de monócitos classicamente ativados ou com perfil M1 é descrita em algumas patologias associadas a distúrbio metabólico, como o diabetes tipo 2 (Satoh et al., 2010) ou com o envolvimento de resposta inflamatória sistêmica, como a sepse (Groselj-Grenc et al., 2008).

Na gestação normal ocorre ativação progressiva de monócitos com expressão aumentada de CD64, sugerindo que a gravidez determina aumento da resposta imune inata (Luppi et al., 2002). Tanto na gestação normal como na PE ocorre aumento da expressão de marcadores de ativação como CD11b, CD14 e CD64, associados a maior nível de reativos intermediários do oxigênio intracelular em comparação a mulheres não-grávidas. Essa ativação leucocitária, observada no 3º. trimestre da gestação, foi ainda maior nas gestantes com PE, confirmando o estado inflamatório exacerbado dessas células na PE.

Numerosas substâncias, tanto exógenas como endógenas, desencadeiam rapidamente a expressão de CD64 em células do sangue periférico. Componentes da parede celular, como LPS, produtos endógenos e citocinas, como IFN-γ e TNF-α são alguns dos ativadores dessas células (Kolackova, 2007). Monócitos ativados, com expressão elevada de receptores CD64 caracterizam-se pela maior capacidade de produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio, de citocinas inflamatórias como TNF- α, IL-12 e IL-23 e indução de resposta Th1 polarizada, sendo

considerados como macrófagos M1 em analogia com a subpopulação celular Th1 (Mantovani et al. 2004). LPS e citocinas como IFN-γ e TNF-α tornam o ambiente inflamatório, favorável à polarização M1, favorecendo a expressão do receptor CD64.

A maior expressão de TLR4 por monócitos de gestantes pré-eclâmpticas, observada no presente trabalho, concorda com resultados de outros autores que relataram aumento da expressão de TLR2 e TLR4 em neutrofilos do sangue periférico (Xie et al., 2010), de TLR4 em placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (Kim et al., 2005) e de TLR4 em células mononucleares de sangue de cordão umbilical de gestantes pré-eclâmpticas, em comparação com gestantes normotensas (Xia et al., 2010). Segundo Kim et al. (2005), a co-localização de TLR4 e TNF-α em células trofoblásticas do leito placentário de pacientes com pré-eclâmpsia sugere que a ativação dessas células na interface materno-fetal pode induzir um ambiente de citocinas desfavorável à gestação, sugerindo ser este um novo mecanismo que desencadeia a ativação do sistema imune inato na pré-eclâmpsia.

Os receptores TLR reconhecem não apenas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), componentes de microrganismos, contribuindo para a defesa do hospedeiro contra infecções, mas também ligam produtos inflamatórios gerados endogenamente e liberados durante lesão tecidual e denominados “sinais de perigo” ou alarminas (Matzinger, 2002; Kim et al., 2005; Sado et al., 2011). Estes produtos consistem de moléculas como reativos intermediários do oxigênio (Frantz et al., 2001), proteínas liberadas de células mortas (Park et al., 2004) e produtos liberados da matriz extracelular, como fibronectina (Okamura et al., 2001). Assim, TLRs podem detectar, sob certas circunstâncias, moléculas derivadas do hospedeiro e agentes não infecciosos (Xie et al., 2010a). Proteínas de choque térmico (Hsps) são consideradas “sinais de perigo” e podem ativar o sistema imune em locais de lesão tecidual ou estresse, onde são liberadas extracelularmente (Chen et al., 1999; Williams & Ireland, 2008). Essas proteinas podem ser ligantes endógenos de TLR2 e TLR4 (Vabulas et al., 2002; Asea et al., 2002) e ativam a via do fator de transcrição nuclear (NF-kB) após ligação a TLR2 e TLR4, induzindo a produção de citocinas inflamatórias e peptídeos anti-microbianos (Xie et al., 2010a).

No presente trabalho, a correlação positiva entre maior expressão de TLR4 e CD64 e a maior produção endógena de TNF-α, IL-12p70 e IL-23 por monócitos sugere que essas células podem estar ativadas por produtos endógenos de origem materna e, enfatizam a participação de receptores TLR na resposta inflamatória sistêmica. Esses resultados sugerem que a presença de um ambiente inflamatório na pré-eclâmpsia pode direcionar a polarização dos monócitos para um perfil M1 ativado, resultando em maior produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células. Xie et al. (2010a) observaram, em gestantes com PE precoce, aumento da expressão de mRNA para TLR2 e TLR4 em neutrófilos, maior produção de IL-1β por essas células e maior concentração sérica de TNF-α e IL-6, sugerindo que TLRs podem modular a imunidade inata e contribuir para a patogênese dessa doença.

Embora estudos prévios tenham relatado ativação excessiva de monócitos em gestantes com PE, evidenciada pela produção elevada de TNF-α, IL-6 e IL-8 em comparação a gestantes normotensas (Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007), este é o primeiro trabalho que associa a expressão de marcadores de ativação à produção de citocinas inflamatórias por monócitos de gestantes pré-eclâmpticas.

Diversos autores demonstraram que alterações nos níveis de citocinas podem estar envolvidas na patogênese da pré-eclâmpsia. Sharma et al. (2010) encontraram na PE desbalanço entre citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-12 e anti-inflamatórias, como IL-10. Nessa patologia pode se configurar um quadro de reação inflamatória sistêmica pela associação entre níveis elevados de ácido úrico, produção de anion superóxido e de TNF-α por monócitos de gestantes pré-eclâmpticas em comparação a gestantes normotensas (Peraçoli et al., 2011).

Os níveis de IL-12p70 e de IL-23 produzidos por monócitos de gestantes com PE, mais elevados em relação às gestantes normotensas estão em acordo com Sakai et al. (2002; 2004), que encontraram maior produção de IL-12 e IL-18 por células mononucleares de sangue periférico de gestantes pré-eclâmpticas, contribuindo para a dominância de um padrão Th1 nessa patologia. A IL-12 é membro da maior família de citocinas que também

compreende IL-23 e IL-27, sendo produzida por várias células apresentadoras de antígeno, incluindo macrófagos e células dendríticas (Metzger, 2010).

O significado da elevada produção endógena de IL-23 por monócitos de gestantes com PE precisa ainda ser esclarecido. Não existem na literatura relatos sobre a produção de IL-23 por células de gestantes com PE. Essa citocina pró-inflamatória é produzida por monócitos, macrófagos e células dendríticas ativadas e tem papel importante na sobrevivência e expansão de células inflamatórias Th17 e na produção de IL-17 por essas células (Gee et al., 2009). Interleucina-23 e IL-17 desempenham papel central no desenvolvimento de inflamações crônicas, observadas em doenças auto-imunes (Paradowska-Gorycka et al., 2010). Recentemente, foi descrito aumento do número de células Th17 no sangue periférico e na decídua de gestantes portadoras de PE, associado à diminuição de células T reguladoras (Santner-Nanan et al., 2009; Jiajun et al., 2009). Segundo Saito (2010), o aumento de células Th17 na PE determinaria um estado inflamatório crônico e causaria hipertensão arterial e disfunção endotelial, características dessa patologia. Portanto, consideramos que os níveis extremamente elevados de IL-23 nas gestantes com PE, em comparação a gestantes normotensas, observados no presente trabalho, sinalizam o desenvolvimento dessas células Th17 e seriam responsáveis pela manutenção da resposta inflamatória sistêmica observada nessa doença. Essa hipótese merece ser testada em trabalhos futuros.

No presente trabalho observou-se menor produção basal de IL-10 pelos monócitos das gestantes com PE, associada à menor expressão de CD163 e CD206 por essas células. A função desta citocina inclui não apenas a atividade imunomodulatória, mas também o papel protetor na hipertensão ou disfunção vascular induzida pela inflamação (Kalkunte et al., 2011). Tinsley et al. (2010) avaliaram o papel da IL-10 sobre a função endotelial e pressão arterial em modelo experimental, demonstrando a capacidade desta interleucina em normalizar a função endotelial e diminuir a pressão sanguínea sistólica. No presente estudo o desbalanço entre citocinas pró- e anti-inflamatórias produzidas in vivo pelos monócitos das gestantes com PE sugere que o ambiente sistêmico inflamatório resultante seria responsável pela diferenciação dos monócitos para o perfil M1 nessa patologia.

O estímulo dos monócitos de gestantes normotensas e portadoras de PE com lipopolissacáride (LPS) e peptidoglicano (PG) teve o objetivo de avaliar a polarização in vitro dessas células nos dois grupos de gestantes estudadas. Observou-se aumento significativo da produção de citocinas inflamatórias TNF-α, IL-12p70 e IL-23 nas culturas de monócitos dos dois grupos de gestantes. Entretanto, as células das gestantes com PE produziram níveis menores de TNF-α do que o grupo GN. Resultados semelhantes foram obtidos por Giorgi et al. (2011) estudando a produção de TNF-α e IL-1β em associação com ativação do fator de transcrição nuclear NF-kB em gestantes portadoras de PE. Os autores verificaram que tanto a produção de TNF-α quanto a ativação da NF-kB foram significativamente menores nas gestantes pré-eclâmpticas após estímulo com LPS. Considerando que o NF-kB está envolvido na produção de TNF-α, nossos resultados corroboram a idéia de exaustão das células *in vivo* de mulheres com PE, sugerida por Beckmann et al. (2004). Segundo esses autores, a pré-ativação e exaustão dos leucócitos, expressas pela liberação espontânea elevada de TNF-α poderia determinar a menor resposta ao LPS. Esses resultados não foram observados na análise da produção de IL-12p70 e IL-23.

A menor capacidade de produção de TNF-α associada à ativação endógena dos leucócitos de gestantes com PE sugere a instalação de um fenômeno denominado tolerância ao LPS. Essa tolerância à endotoxina foi interpretada como a capacidade reduzida de de monócitos e macrófagos cultivados in vitro, em responder ao estímulo com LPS após uma exposição prévia a concentrações baixas da endotoxina (Fan et al., 2007; Aneja et al., 2008). Assim, a tolerância induz um estado transitório de supressão celular, com produção diminuída de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS (Virca et al., 1989).

Segundo Albrecht et al. (2008), diferentes mecanismos de tolerância podem ocorrer em diferentes tipos celulares. A deleção celular é o principal mecanismo envolvendo linfócitos, enquanto em monócitos predomina o bloqueio de sinais de transdução celular. Estudando a tolerância induzida por estimulação repetida com ligantes de TLR2 e TLR4 em células dendríticas, os autores demonstraram que a exposição a esses ligantes torna as células

tolerantes em relação à expressão do gene de TNF por um mecanismo que envolve bloqueio do sinal de transdução ao nível do receptor de IL-1 associado à quinase 1 (IRAK-1) devido à sua degradação proteolítica.

A possível tolerância ao LPS em gestantes com PE, com menor produção de TNF-α , foi descrita por outros autores (Beckmann et al., 2004). No presente trabalho os resultados permitem sugerir que a ativação prévia das células, com maior produção endógena de TNF-α, seria responsável pela tolerância ao LPS quando as células são estimuladas in vitro com a endotoxina. Em gestantes com PE o estímulo in vivo que determina a ativação dos leucócitos, permitindo a tolerância ao estímulo com LPS, ainda não é conhecido. Entretanto, é descrito que a resposta inflamatória sistêmica exacerbada na PE está associada com a liberação de substâncias com atividade inflamatória, tais como fragmentos de membranas do sinciciotrofoblasto, DNA fetal solúvel, micropartículas derivadas de leucócitos e citocinas, que ativariam sistemicamente células inflamatórias como monócitos, granulócitos e células endoteliais (Redman & Sargent, 2005; Borzychowski et al., 2006; Germain et al., 2007; Lok et al., 2009). Além disso, outras proteínas intracelulares, como a proteina de choque térmico hsp70, quando presente no compartimento extracelular pode induzir a tolerância ao LPS (Aneja et al., 2006). Níveis elevados de hsp70 foram descritos no soro de gestantes com PE, sendo associados à inflamação sistêmica e estresse oxidativo, embora não se conheça o papel dessa proteína na fisiopatologia da PE (Molvarec et al., 2009).

A maior expressão de TLR2 e TLR4, após estímulo com PG ou LPS respectivamente, foi observada em monócitos de gestantes normotensas. Esses resultados concordam com a literatura, que relata aumento da expressão de CD14, TLR2 e TLR4 em monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis após estímulo com esses agonistas de TLRs (Hadley et al., 2005). Nas gestantes normotensas a expressão de CD64 mostrou-se também significativamente aumentada após estímulo dos monócitos com LPS e PG. Ao contrário, nas gestantes com PE o estímulo com LPS e PG não induziu aumento na expressão de TLR2, TLR4 e CD64 nos monócitos. A ausência de polarização dessas células submetidas a estímulo pode decorrer de sua prévia ativação endógena.

Com relação à expressão de CD163 e CD206, embora a expressão endógena desses receptores tenha se apresentado menor nos monócitos das gestantes com PE, o estímulo com LPS foi capaz de aumentar a expressão desses receptores, mostrando a possibilidade de polarização dessas células para perfil M2. Essa polarização in vitro, induzida por LPS e PG, foi melhor observada na indução da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em ambos os grupos de gestantes. Assim, encontrou-se maior produção de TNF-α, IL-10, IL-12p70 e IL-23 por monócitos estimulados em gestantes normotensas. Nas gestantes pré-eclâmpticas o estímulo com LPS e PG induziu aumento significativo dos níveis de TNF-α, IL-10 e IL-23. A produção de IL-12p70 só foi mais elevada após estimulo com PG. A correlação entre a produção basal de TNF-α, IL-12p70 e IL-23 pelos monócitos das gestantes com PE mostra que a ativação in vivo dessas células interferiu com a capacidade de estimulação por LPS, na produção de IL-12.

A literatura relata a polarização de monócitos do perfil M1 para M2 e vice-versa, induzida in vitro por substâncias estimuladoras ou reguladoras de monócitos e macrófagos. LPS é considerada uma potente endotoxina indutora de inflamação e polarização M1 (Pena et al., 2011). Devaraj & Jialal (2011) observaram que, monócitos de perfil M2 gerados por estímulo com IL-4, quando cultivados com proteína C-reativa sofrem diferenciação para população M1, produtora de TNF-α e IL-12. Por outro lado, azitromicina, que possui atividade anti-inflamatória, modifica a ativação de macrófagos para o fenótico M2. A adição prévia de azitromicina, à cultura de monócitos humanos estimulados com IFN-γ e LPS inibe, de forma dose-dependente a expressão de genes promotores da produção de IL-12p70 e de marcadores de perfil M1 e aumenta a expressão de CD163 e IL-10, característicos de perfil M2 (Vrancik et al., 2011).

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que monócitos de gestantes com PE encontram-se endogenamente ativados e diferenciados para o perfil inflamatório M1. Essa polarização para o espectro inflamatório seria induzida e sustentada pelo ambiente predominante de citocinas inflamatórias presente nessa patologia. Considerando que a PE é caracterizada por um estado inflamatório persistente (Sado et al., 2011),

envolvendo células da imunidade inata como monócitos, o estudo da participação do sistema imune inato nessa inflamação sustentada poderá contribuir para a melhor compreensão da sua fisiopatologia.

6. CONCLUSÕES

6.1. Monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia apresentam-se endogenamente ativados e produzem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-12p70 e IL-23 em comparação às gestantes normotensas;

6.2. A expressão endógena elevada de receptores TLR4 e CD64, associada à baixa expressão de CD163 e CD206 por monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia e à produção de citocinas pró-inflamatórias, sugere a polarização dessas células para um perfil M1 na pré-eclâmpsia;

6.3. Este estudo traz evidências de que na pré-eclâmpsia ocorre um desequilíbrio do fenótipo M1/M2 de monócitos do sangue periférico e, que o ambiente inflamatório sistêmico observado nessa patologia pode ser responsável pela diferenciação das células para o perfil M1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). Committee on Obstetric Practice. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Int J Gynaecol Obstet. 2002, 77:67–75.

Albrecht V, Hofer TP, Foxwell B, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock L. Tolerance induced via TLR2 and TLR4 in human dendritic cells: role of IRAK-1. BMC Immunol. 2008; 9:69.

Aneja R, Odoms K, Dunsmore K, Shanley TP, Wong HR. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. J Immunol. 2006; 177:7184-92.

Aneja RK, Tsung A, Sjodin H, Gefter JV, Delude RL, Billiar TR, Fink MP. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance. J Leukoc Biol. 2008; 84:1326-34.

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J Biol Chem. 2002; 277(17):15028-34.

Babu S, Kumaraswami V, Nutman TB. Alternatively activated and immunoregulatory monocytes in human filarial infections. J Infect Dis 2009; 199(12):1827-37.

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.

Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. Cell Metab. 2007; 6(2):137-43.

Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 1968; 97:77-89.

Brewster JA, Orsi NM, Gopichandran N, Ekbote UV, Cadogan E, Walker JJ. Host inflammatory response profiling in preeclampsia using an in vitro whole blood stimulation model. Hypertens Pregnancy. 2008; 27(1):1-16.

Carreiras M, Montagnani S, Layrisse Z. Preeclampsia: a multifactorial disease resulting from the interaction of the feto-maternal HLA genotype and HCMV infection. Am J Reprod Immunol. 2002; 48(3):176-83.

Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. J Immunol. 1999; 162(6):3212-9.

Colbern GT, Chiang MH, Main EK.Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. Am J Obstet Gynecol. 1994; 170(5 Pt 1):1244-50.

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

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; 1:129-31.

Dekker GA, Sibai BM. The immunology of preeclampsia. Semin Perinatol. 1999; 23(1):24-33.

Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein polarizes human macrophages to an M1 phenotype and inhibits transformation to the M2 phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011; 31(6):1397-402.

Fan H, Williams DL, Zingarelli B, Breuel KF, Teti G, Tempel GE, Spicher K, Boulay G, Birnbaumer L, Halushka PV, Cook JA. Differential regulation of lipopolysaccharide and Gram-positive bacteria induced cytokine and chemokine production in macrophages by Galpha(i) proteins. Immunology 2007; 122:116-23.

Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. J Biol Chem. 2001; 276(7):5197-203.

Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. Inflamm Allergy Drug Targets. 2009; 8(1):40-52.

Genbacev O, DiFederico E, McMaster M, Fisher SJ. Invasive cytotrophoblast apoptosis in pre-eclampsia. Hum Reprod. 1999; 14(Suppl 2):59-66.

Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, Sargent IL, Redman CW. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. J Immunol. 2007;178(9):5949-56.

Giorgi VSI, Bannwart-Castro C, Peraçoli JC, Peraçoli MTS. Silibinin modulates NF-kB pathway and proinflammatory cytokines in mononuclear cells of preeclamptic women. Abstract of the XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2011, Foz do Iguaçu, PR.

Gordon S. Alternatively activation of macrophages. Nat Rev Immunol 2003; 3(1):23-35.

Gordon S, Martinez FO.Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity. 2010; 32(5):593-604.

Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, von Dadelszen P: Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. Placenta 2006; 27(1):56–61.

Gotsch F, Romero R, Friel L, Kusanovic JP, Espinoza J, Erez O, Than NG, Mittal P, Edwin S, Yoon BH, Kim CJ, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T, Hassan SS. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? J Matern Fetal Neonatal Med. 2007; 20(11):777-92.

Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. Mediators Inflamm. 2008; 2008:202646.

Hadley JS, Wang JE, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ. Peptidoglycan of Staphylococcus aureus upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. Infect Immun. 2005; 73(11): 7613-9.

Jianjun Z, Yali H, Zhiqun W, Mingming Z, Xia Z. Imbalance of T-cell transcription factors contributes to the Th1 type immunity predominant in pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol, 2009; 63(1):38–45.

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

Kalinderis M, Papanikolaou A, Kalinderi K, Ioannidou E, GIannoulis C, Karagiannis V, Tarlatzis BC. Elevated Serum Levels of Interleukin-6,

Interleukin-1β and Human Chorionic Gonadotropin in Pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol 2011; 66(6):468-75.

Kalkunte S, Nevers T, Norris WE, Sharma S. Vascular IL-10: a protective role in preeclampsia. Journal of reproductive immunology 2011; 88(2): 165-9.

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.

Kolackova M, Kudlova M, Kunes P, et al. Early expression of FcgammaRI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte anti-inflammatory scavenger CD163 receptor in "on-pump" patients. Mediators of inflammation. 2008; 2008:235461.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature 2001; 409(6817):198-201.

Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A, Van Der Post JA. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 2009; 61:346-359.

Lovren F, Pan Y, Quan A, Szmitko PE, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, Chan L, Al-Omran M, Teoh H, Verma S. Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010; 299(3):H656-63.

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

Luppi P, Haluszczak C, Betters D, Richard CA, Trucco M, DeLoia JA. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. J Leukoc Biol. 2002; 72(5):874-84.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A.Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol. 2002; 23(11):549-55.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 2004; 25(12):677-686.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. Front Biosci 2008; 13:453-61.

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

Metzger DW. Interleukin-12 as an adjuvant for induction of protective antibody responses. Cytokine. 2010;52(1-2):102-7.

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol 2003; 73(2):209-12.

Mütze S, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Rath W. Genes and the preeclampsia syndrome. J Perinat Med. 2008; 36(1):38-58.

Myers J, Mires G, Macleod M, Baker P. In preeclampsia, the circulating factors capable of altering in vitro endothelial function precede clinical disease. Hypertension. 2005; 45(2):258-63.

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):511-7.

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.

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.

Paradowska-Gorycka A, Grzybowska-Kowalczyk A, Wojtecka-Lukasik E, Maslinski S. IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Scand J Immunol. 2010; 71(3):134-45.

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.

Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock RE. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. J Immunol. 2011;186(12):7243-54.

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(3):177-85.

Peraçoli MT, Menegon FT, Borges VT, de Araújo Costa RA, Thomazini-Santos IA, Peraçoli JC. Platelet aggregation and TGF-beta (1) 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.

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.

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. Clin Exp Immunol. 2005; 142(3):481-9.

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. 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.

Redman CW, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. Placenta. 2009; 30(Suppl A):S38-42.

Sado T, Naruse K, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Tanase Y, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Inflammatory pattern recognition receptors and their ligands: factors contributing to the pathogenesis of preeclampsia. Inflamm Res. 2011; 60(6):509-20.

Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatpry T-cell paradigm in pregnancy. Am J Reprod Immunol., 2010; 63(3):601–10.

Sakai M, Shiozaki A, Sasaki Y, Yoneda S, Saito S. The ratio of interleukin (IL)-18 to IL-12 secreted by peripheral blood mononuclear cells is increased in normal pregnant subjects and decreased in pre-eclamptic patients. J Reprod Immunol. 2004; 61(2):133-43.

Sakai M, Tsuda H, Tanebe K, Sasaki Y, Saito S. Interleukin-12 secretion by peripheral blood mononuclear cells is decreased in normal pregnant subjects and increased in preeclamptic patients. Am J Reprod Immunol. 2002; 47(2):91-7.

Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. J Immunol 2009; 183(11):7023–30.

Satoh N, Shimatsu A, Himeno A, Sasaki Y, Yamakage H, Yamada K, Suganami T, Ogawa Y. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. Diabetes Care. 2010; 33(1):e7.

Sharma D, Singh A, Trivedi SS, Bhattacharjee J. Role of endothelin and inflammatory cytokines in pre-eclampsia - A pilot North Indian study. Am J Reprod Immunol. 2010; 65(4):428-32.

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

Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. Semin Cancer Biol. 2008; 18(5):349-55.

Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. Lancet. 2010; 376(9741):631-44.

Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. BMC Immunol. 2010;11:59.

Tinsley JH, South S, Chiasson VL, Mitchell BM. Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats. Am J Physiol 2010; 298(3):R713-9.

Trogstad L, Skrondal A, Stoltenberg C, Magnus P, Nesheim BI, Eskild A. Recurrence risk of preeclampsia in twin and singleton pregnancies. Am J Med Genet A. 2004; 126A(1):41-5.

Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. Vasc Health Risk Manag. 2011; 7:467-74.

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem. 2002; 277(17):15107-12.

Virca GD, Kim SY, Glaser KB, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide induces hyporesponsiveness to its own action in RAW 264.7 cells. J Biol Chem. 1989; 264(36):21951-6.

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.

Vrančić M, Banjanac M, Nujić K, Bosnar M, Murati T, Munić V, Polančec DS, Belamarić D, Parnham MJ, Haber VE. Azithromycin distinctively modulates classical activation of human monocytes in vitro. Br J Pharmacol. 2011, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01576.x.

Williams JH, Ireland HE. Sensing danger--Hsp72 and HMGB1 as candidate signals. J Leukoc Biol. 2008; 83(3):489-92.

Williams PJ, Pipkin FB. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2011; 25(4):405-17.

Xia G, Xu D, Wu M, Wu C. Expression of Toll-like receptor 4 in neonatal cord blood mononuclear cells in patients with preeclampsia. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2010; 30(5):615-9.

Xie F, Hu Y, Turvey SE, Magee LA, Brunham RM, Choi KC, Krajden M, Leung PC, Money DM, Patrick DM, Thomas E, von Dadelszen P. Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. BJOG. 2010; 117(1): 99-108.

Xie F, Turvey SE, Williams MA, Mor G, von Dadelszen P. Toll-like receptor signaling and pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2010a; 63(1):7-16.

Zhang J, Zeisler J, Hatch MC, Berkowitz G. Epidemiology of pregnancy-induced hypertension. Epidemiol Rev. 1997; 19(2):218-32.

Zuwala-Jagiello J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. Acta Biochim Pol 2006; 53(2):257-68.

ANEXOS

Anexo 1

Universidade Estadual Paulista
CAMPUS DE BOTUCATU – INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
Cx. Postal: 510 – Botucatu – SP – CEP – 18618 – 000
Fone (14) 3811-6058 / 6240 – Fax (14)3811-3744

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA - Indivíduos Saudáveis

Eu, _____ RG _____ doador voluntário de sangue, fui convidado a participar do projeto intitulado: **"CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS M1 E M2 E ASSOCIAÇÃO COM PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPSIA".** Nesta pesquisa, fui solicitado a doar pequena quantidade de sangue da veia do braço (20 mL), colhido com seringa e agulha descartável. Estou ciente de que a doação desse volume de sangue não trará riscos à minha saúde, uma vez que os 20 mL serão retirados do total de sangue obtido durante a doação. Concordo em colaborar e informo não ter sido pressionado física ou psicologicamente. O exame a ser realizado no sangue servirá para verificar se a minha capacidade de não desenvolver doença infecciosa está diminuída ou normal, caso eu entre em contato com microrganismos do ar. Como doador voluntário, estou sabendo que não terei benefícios direto com a pesquisa. O pesquisador informou que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo. Fui informado 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. Este documento, após aprovação do CEP, será elaborado em 2 vias, sendo uma para o participante do projeto e a outra para o arquivo do pesquisador.

Botucatu, ___ de _____de 20__

_____
Assinatura do Doador

_____
Assinatura do Pesquisador

Pesquisador Responsável: Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros
Rua Dr. Ranimiro Lotufo nº 463 – Botucatu, SP
Fone: (14)96265619
E-mail: leomedeiros07@hotmail.com

Orientador Responsável: Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Rua Cardoso de Almeida nº1613 – ap. 602 – Botucatu, SP
Fone: (14) 3815-3740
E-mail: peracoli@ibb.unesp.br

Anexo 2

unesp Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br

Ética

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 05 de outubro de 2.009 . OF. 365/2009-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Titular Maria Therezinha Serrão Peraçoli
Departamento de Micro/Imuno do
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezada Drª Therezinha,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, **(Protocolo CEP 3328-2009) "Caracterização das subpopulações de monócitos M1 e M2 e associação com produção de citocinas em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia"**, que será conduzido por Vossa Senhoria, com a colaboração do Prof. Titular José Carlos Peraçoli e Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 05/10/09.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP **"Relatório Final de Atividades"**.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP