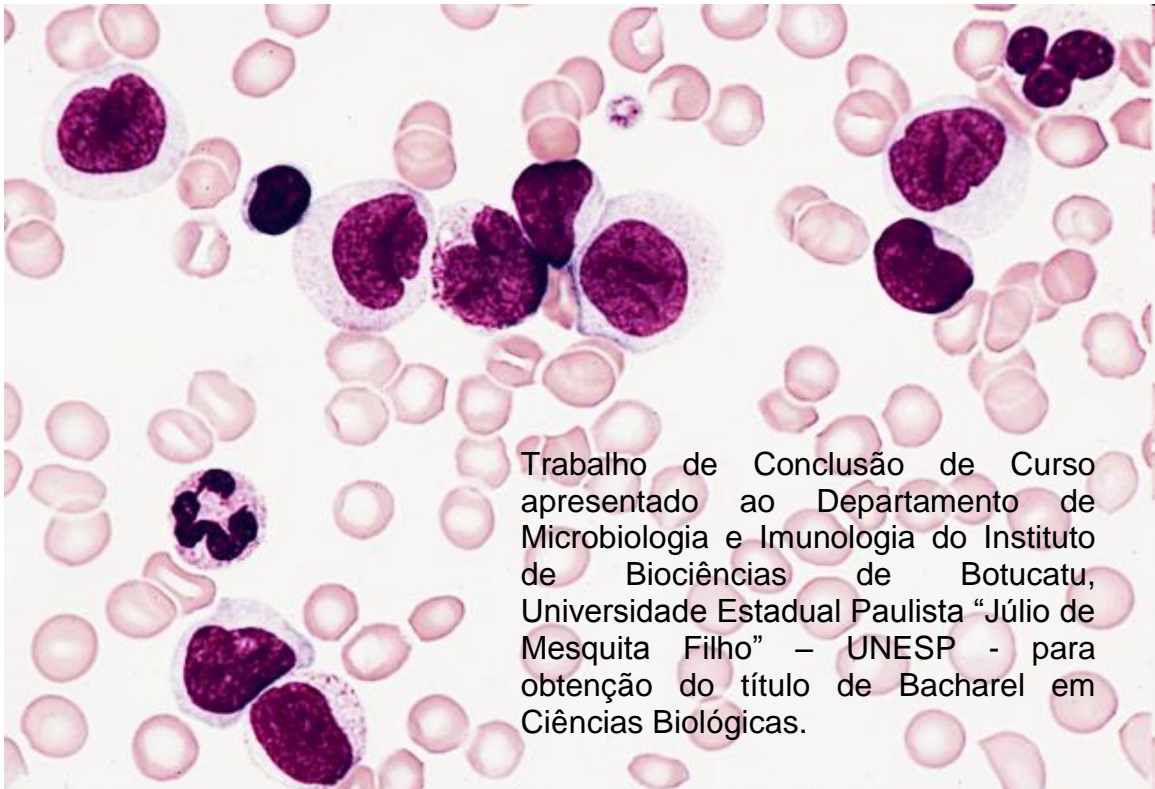


MARIANA ROMÃO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE
RECEPTORES TLR2 E TLR4 E PRODUÇÃO DE
TNF-ALFA E IL-10 POR MONÓCITOS DE
GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPسيا**



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Co-orientadora: Dr^a. Camila Ferreira Bannwart Castro

Botucatu

2011

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

Romão, Mariana.

Associação entre expressão de receptores TLR2 e TLR4 e produção de TNF-alpha e IL-10 por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Mariana Romão. – Botucatu : [s. n], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Co-orientador: Camila Ferreira Bannwart Castro

Capes: 21104000

1. Gravidez – Complicações. 2. Monócitos. 3. Pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: Monócitos; Pré-eclâmpsia; TLR; TNF-alpha; IL-10.

Aos meus pais, José Carlos e Helena.

AGRADECIMENTOS

Considerando esta monografia como resultado de um longo caminho que não começou na UNESP, agradecer pode ser uma tarefa difícil. Para não ser injusta, agradeço primeiramente a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Dentre estes agradeço especialmente:

À professora Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por ser muito mais que uma orientadora, ser amiga, que com muito carinho e compreensão tornou a imunologia algo tão interessante que foi impossível não gostar, meu muito obrigada pela dedicação e ajuda por esses anos de trabalho e convívio.

À minha co-orientadora e amiga Camila Ferreira Bannwart Castro, pela amizade e por sempre estar disposta a ensinar e ajudar, mesmo quando atrapalhava seu trabalho.

À minha companheira de laboratório e amiga-irmã Ingrid Cristina Weel, por simplesmente existir em minha vida, e estar sempre comigo, obrigada por me ensinar a ver a vida de outras maneiras.

Aos meus amigos do LAB 3, Érika, Vanessa, Leonardo e Vanessa (Pink) pela ajuda, ensinamentos, amizade, risadas, sustos e artes, obrigada por produzirem um ambiente de trabalho tão divertido e agradável.

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

Aos meus amigos, Juliana, Paola, Fernando, a famigerada Bio XLII e a guild Mean Machine, pelas horas de diversão, discussão, alegria e por permitirem que eu fizesse parte de suas vidas.

Aos meus pequenos Natália, Murilo, João Pedro e Mateus que só fazem alegrar a minha vida.

Ao meu namorado José Alberto (Beto) por todos esses anos, de muito carinho, amizade, companheirismo e felicidade. Obrigada por me aguentar amor!

A toda minha família, tios, tias, avô e avó, primos e primas, aos meus pais José Carlos e Helena, meus irmãos Danilo e Gustavo e a minha Tia Maria que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, me fazendo acreditar que nada é impossível. Vocês são a minha vida!

“Limitações são fronteiras criadas apenas pela nossa mente”

Provérbio Chinês

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Pacientes	12
3.2. Critérios de inclusão	13
3.3. Critérios de exclusão	13
3.4. Dosagem da proteinúria	13
3.5. Colheita de sangue	13
3.6. Isolamento e cultura de monócitos	14
3.7. Obtenção de sobrenadante de cultura de monócitos	14
3.8. Determinação das citocinas TNF- α e IL-10	15
3.9. Expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de monócitos	16
3.10. Análise Estatística	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Características das gestantes e mulheres não-grávidas	17
4.2. Determinação de TNF- α	18
4.3. Determinação de IL-10	19
4.4. Expressão de TLR2 e TLR4	20
5. DISCUSSÃO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica, de maior intensidade do que a observada na gestação normal. Células do sistema imunológico como monócitos e granulócitos encontram-se ativadas endogenamente e secretam níveis elevados de radicais livres e citocinas inflamatórias. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o estado de ativação endógena de monócitos pela expressão de *toll like receptor* (TLR) 2 e TLR4 nessas células em gestantes portadoras de PE e relacionar a expressão desses receptores com a produção de fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10) por essas células estimuladas ou não com lipopolissacáride (LPS) e peptidoglicano (PG), considerados agentes agonistas de TLR4 e TLR2, respectivamente. Foram estudadas 30 gestantes, sendo 15 gestantes normais e 15 portadoras de PE, pareadas pela idade gestacional, além de 15 mulheres não-grávidas. Monócitos de sangue periférico foram incubados a 37°C, em atmosfera constante de 5% de CO₂, na presença ou ausência de LPS ou de PG. O sobrenadante obtido após 18h de cultivo foi aspirado e empregado para dosagem das citocinas TNF- α e IL-10 por ensaio imunoenzimático (ELISA). A expressão endógena dos receptores TLR2 e TLR4 presentes na superfície dos monócitos foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram concentrações significativamente mais elevadas de TNF- α , assim como de expressão de TLR4 em monócitos de mulheres portadoras de PE em comparação às grávidas normais e não-grávidas. Gestantes normais apresentaram altos níveis de IL-10 em relação às gestantes com PE e mulheres não-grávidas. A expressão de TLR2 foi similar nos três grupos estudados. Portanto, nosso trabalho ressalta a importância do papel de TLR4 na PE e a conseqüente alta produção de TNF- α por monócitos dessas pacientes, bem como o potencial mecanismo envolvendo os baixos níveis de IL-10 na fisiopatologia da doença. Essas observações evidenciam a forte ligação entre a patologia da PE e o sistema imune dessas pacientes.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia; monócitos; TLR; TNF-alpha; IL-10.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a pregnancy specific syndrome characterized by a systemic inflammatory response, with higher intensity than that observed in normal pregnancy. Cells of the immune system, such as monocytes and granulocytes are endogenously activated and secrete high levels of free radicals and inflammatory cytokines. The objective of this study was to assess the activation state of monocytes from pregnant women with preeclampsia by endogenous expression of TLR2 e TLR4 receptors and to correlate the expression of TLR2 and TLR4 on monocytes surface of pregnant women with PE with the production of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) by these cells stimulated or not with peptidoglycan (PG) and lipopolysaccharide (LPS), as agonists agents of TLR2 and TLR4, respectively. We evaluated 15 pregnant women with PE, 15 normotensive pregnant women (NT) and 15 non-pregnant (NP). Peripheral blood monocytes were incubated in the presence or absence of LPS or PG. The supernatant obtained after 18h of culture was aspirated and used for TNF- α and IL-10 determination by enzyme immunoassay (ELISA). The endogenous expression of TLR2 and TLR4 receptors was evaluated by flow cytometry. Our results showed significant highly concentrations of TNF- α and TLR4 expression in monocytes of preeclamptic women when compared with NT and NP. Normal pregnant women presented higher levels of IL-10 in comparison with PE and NP groups. TLR2 expression was similar in the three groups studied. Therefore, our study highlights the important role of TLR4 in PE and the consequent high production of TNF- α by monocytes of these patients, as well as the potential mechanism involving low levels of IL-10 in the pathophysiology of the disease. These observations demonstrate the strong link between the pathology of PE and the immune system of these patients.

Key-words: preeclampsia, monocytes, TLR, TNF-alpha, IL-10.

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez que incide entre 3% e 8% das gestações (Carty et al., 2010; Uzan et al., 2011). Ocorre principalmente em primigestas e é considerada a principal causa de morbidade e mortalidade materna e perinatal, principalmente nos países em desenvolvimento (Sibai et al., 2005; Duley, 2009). É uma doença sistêmica, caracterizada por múltiplas alterações no organismo materno (Wegmann et al., 1993) e clinicamente identificada pela manifestação de hipertensão arterial, proteinúria e outros distúrbios sistêmicos a partir da segunda metade da gestação (Roberts & Redman, 1993; Rein et al., 2003; Paternoster et al., 2004).

Embora a PE seja uma doença ainda sem etiologia, está demonstrado que sua fisiopatologia é influenciada diretamente pela placenta (Robillard, 2002; Redman & Sargent, 2005). Fundamentada nesse conceito, a literatura sugere a interação de vários mecanismos responsáveis pela característica multisistêmica da doença: placentação inadequada (Pijnenborg et al., 1983), 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).

A gestação normal é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica leve, que se inicia durante a fase luteínica do ciclo menstrual, antes que ocorra a implantação e desenvolve-se com o progresso da gestação (Borzychowski et al., 2006). As alterações inflamatórias leves resultantes da ativação da imunidade inata não indicam doença, mas parecem proteger o organismo materno contra infecções, uma vez que a reatividade da resposta imune específica se encontra ligeiramente diminuída (Wegmann et al., 1993). Monócitos mostram sinais de ativação da atividade fagocítica (Koumandakis et al., 1986) e de produção de citocinas (Sacks et al., 2003).

Na PE ocorre uma reação inflamatória sistêmica, semelhante à observada na gestação normal, porém de maior intensidade (Redman et al., 1999). Essa doença parece ser, portanto, resultante de uma ativação exacerbada da resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias, como monócitos e

granulócitos, bem como células endoteliais (Schuiling et al., 1997; Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006). Essa patologia é caracterizada pela produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Johnson et al., 2002; Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007) e quimiocinas (Visser et al., 2007), bem como por alterações na produção de citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- β (Pestka et al., 2004; Visser et al., 2007; Peraçoli et al., 2008). Peraçoli et al. (2007), avaliando a produção de TNF- α em gestantes normais e com PE, verificaram que tanto os níveis séricos como a produção endógena da citocina por monócitos de sangue periférico foram significativamente mais elevados em gestantes portadoras de PE, sugerindo o estado de ativação dessas células.

É sabido na literatura que o estresse oxidativo também está envolvido na fisiopatologia da PE (Kharb et al., 2000; Takagi et al., 2004), decorrente da ativação dos leucócitos, que atuando de maneira sistêmica, causam lesão do endotélio (Rein et al., 2003). Em trabalho anterior realizado em nosso laboratório, Peraçoli et al. (2009) verificaram que monócitos de gestantes portadoras de PE encontravam-se ativados endogenamente e produzindo níveis mais elevados de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de TNF- α em comparação com gestantes normais.

Huppertz et al. (2003) relataram que, na gestação de termo, grande quantidade de debris do trofoblasto são liberados na circulação materna, originados de células apoptóticas do trofoblasto. A ingestão de células apoptóticas por fagócitos resulta em resposta anti-inflamatória sistêmica (Abraham et al., 2004). Por outro lado as condições de hipóxia, inflamação excessiva e estresse oxidativo induzem necrose ou apo-necrose do trofoblasto (Huppertz et al., 2003). Quando macrófagos ou células dendríticas fagocitam esses corpos apo-necróticos ou necróticos, produzem TNF- α , IL-12 e IFN- γ e aumentam a inflamação (Huppertz et al., 2003; Abrahams et al., 2004).

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 patogênese da PE é ainda desconhecido.

Células do sistema imune inato expressam receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) considerados componentes

centrais do sistema imune inato e envolvidos na resposta inflamatória de monócitos (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Entre os vários PRRs a principal família é denominada 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; Lu et al., 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 divididos 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 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 consistem de moléculas tais 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). 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 tem sido 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 resultados sugerem que não apenas células imunes, mas também outros tipos celulares da placenta possuem capacidade de responder a patógenos invasores, desempenhando papel fisiológico protetor na placenta.

Kim et al. (2005) demonstraram que a expressão de TLR4 está aumentada em células trofoblásticas de pacientes com PE, 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 das 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 desencadeia a ativação do sistema imune inato na PE.

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

2. OBJETIVO

Avaliar a expressão endógena de receptores TLR2 e TLR4 e os níveis de TNF- α e IL-10 produzidos por monócitos do sangue periférico de gestantes portadoras de PE, gestantes normais e mulheres não-grávidas, estimulados ou não com LPS ou PG.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Foram estudadas 15 gestantes portadoras de PE e 15 gestantes normais, que realizaram a assistência ao parto na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Mulheres saudáveis, não-grávidas (n= 15) doadoras voluntárias de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e de faixa etária semelhante à das gestantes, também foram recrutadas para a realização do presente trabalho.

As gestantes foram consideradas portadoras de PE quando, sem antecedente de hipertensão arterial, manifestaram hipertensão arterial ($\geq 140 \times 90$ mmHg) associada à proteinúria (≥ 300 mg 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 esclarecido. O projeto de pesquisa foi enviado para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

3.2. Critérios de inclusão

Grupo mulheres saudáveis (mulheres não-grávidas): ser saudável e não grávida e doadora voluntária do banco de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP;

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

Grupo estudo (pré-eclâmpsia): ser gestante portadora de PE, sem outras complicações clínicas ou obstétricas.

3.3. Critérios de exclusão

Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de PE 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

Foram coletados 10 mL de sangue por punção venosa para avaliação da expressão dos receptores TLR2 e TLR4 e produção de citocinas por monócitos de gestantes portadoras de PE no momento do diagnóstico da doença. A amostra de sangue de gestantes normais foi coletada no momento em que foram pareadas pela idade gestacional com gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não-grávidas, a

partir do sangue doado no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

3.6. Isolamento e cultura de monócitos

O sangue periférico obtido dessas mulheres foi colocado em tubo estéril contendo 20UI/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 Boyum (1968). O anel rico em células mononucleares foi lavado, duas vezes, com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) por 10 min a 200g. Após esses procedimentos as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma), 40µg/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. Para isso, 50µL da suspensão de células mononucleares foram incubadas por 10 min a 37°C com 450uL da solução de vermelho neutro a 0,02%. Os monócitos foram diferenciados por apresentarem citoplasma de coloração vermelha e a concentração celular foi ajustada para 5×10^5 monócitos viáveis/mL, após contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer. Essas células foram distribuídas em placas de cultura de 24 ou em tubos para citômetro (Linbro, Flow Lab, USA) e incubadas por 60 min a 37°C, em tensão de 5% de CO₂. 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 avaliação da produção de citocinas, os monócitos, obtidos conforme descrito no item 3.6 foram incubados a 37°C, em tensão de 5% de CO₂ por 18h, na ausência ou presença de LPS ou de PG, ambos na concentração de 1µg/mL. O sobrenadante obtido após 18h de cultivo foi aspirado, centrifugado a 600g e distribuído em alíquotas, que foram conservadas a -80°C até o momento da dosagem das citocinas TNF- α e IL-10, poro ensaio imunoenzimático (ELISA).

3.8. Determinação das citocinas TNF- α e IL-10

Para quantificação das citocinas nos sobrenadantes de cultura de monócitos, tratados ou não com LPS ou PG foi empregado kits comerciais específicos obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). As reações foram desenvolvidas segundo as instruções do fabricante e descritas conforme a técnica abaixo.

Placas de 96 orifícios e fundo plano (MaxiSorp-Nunc Life Tech. Inc., Maryland, MA, USA) foram sensibilizadas por 18h a 5°C com anticorpo monoclonal anti-citocina específica, diluído em PBS. Após esse período, os orifícios foram lavados três vezes com 300 μ L de PBS, pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). Para o bloqueio da placa foi adicionado, em cada orifício, 300 μ L de PBS + BSA 1%, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 60 min. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100 μ L dos sobrenadantes gerados e das citocinas recombinantes (R&D Systems) foram 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 100 μ L de estreptoavidina conjugada com peroxidase (R&D Systems), na concentração de 2 μ g/mL por 20 min a 37°C, seguido pela lavagem da placa com PBST. Após esse período, foram adicionados 100 μ L do substrato enzimático, constituído por 10 μ L de H₂O₂ a 30% (Sigma), 1mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma), diluídos em 12,5mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 20min e a reação foi bloqueada pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 2M. 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 PEP, foram calculadas a partir das curvas-padrão realizadas com as diferentes citocinas recombinantes humanas. Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonais e policlonais, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas-padrão, foram aquelas recomendadas pelo fabricante (R & D Systems)

3.9. Expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de monócitos

A expressão de TLR2 e TLR4 por monócitos de gestantes portadoras de PE, gestantes normais e mulheres não-grávidas foi avaliada após a realização da colheita do sangue (expressão endógena). A concentração celular foi ajustada para 5×10^5 monócitos viáveis/mL, distribuídos em tubos Falcon para citômetro (BD Labware). As células foram então incubadas com anti-TLR2 conjugado com FITC (BioLegend, Inc, San Diego, CA, USA), com anti-TLR4 conjugado com PE (BioLegend) e com anti-CD14 conjugado com PeCy7 (BioLegend) durante 20 min. Para cada teste, um tubo controle foi incubado com anticorpos isotípicos marcados com os fluorocromos específicos. Os monócitos foram centrifugados por 10 minutos a 200g para lavagem e ressuspendidos em 500 μ L de ISOTON II e fixados com 50 μ L de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD Labware). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo modelo FACSCALIBUR™ (Becton Dickinson) usando programas “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, estabelecido nos monócitos positivos para CD14, a média de intensidade de fluorescência (MIF) de TLR2 e TLR4 foi avaliada.

3.10. Análise Estatística

Os resultados referentes à expressão endógena dos receptores TLR2 e TLR4 e da produção de TNF- α e IL-10 por monócitos de gestantes com PE, gestantes normais e mulheres não-grávidas foram analisados empregando-se testes não paramétricos. 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 e mulheres não-grávidas

Na Tabela 1 podemos observar que não houve diferença estatística entre os parâmetros estudados de idade e idade gestacional entre os três grupos avaliados. No entanto, os valores da pressão arterial sistólica e diastólica foram significativamente maiores nas gestantes portadoras de PE em relação às gestantes normais e mulheres não-grávidas.

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

Parâmetros	Mulheres não-grávidas (NG)	Gestantes normais (GN)	Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE)
Idade (anos)	26 (20 - 35)	23 (16 - 29)	23 (15 - 36)
Idade gestacional (semanas)	—	31 (21 - 40)	35 (23 - 40)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	110 (100 - 120)	105 (95 - 110)	150 * (140 - 180)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	70 (65 - 80)	60 (60 - 70)	100 * (90 - 120)
Proteinúria (mg/24h)	negativa	negativa	840 (300 - 17.550)

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

*(p<0,005) vs NG e GN - teste Kruskal-Wallis.

4.2. Determinação de TNF- α

A avaliação dos níveis de TNF- α produzidos por monócitos demonstrou concentração endógena significativamente mais elevada dessa citocina inflamatória em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) quando comparadas com gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG).

Após estímulo com LPS, todos os grupos tiveram aumento significativo das concentrações de TNF- α , porém os monócitos dos grupos GN e NG produziram níveis significativamente maiores da citocina inflamatória quando comparados com as PE.

Ao estimular os monócitos com PG, os três grupos estudados demonstraram um significativo aumento na produção da citocina em relação à produção endógena dessas células. No entanto, o grupo GN apresentou níveis significativamente mais elevados na produção de TNF- α quando comparado com os grupos PE e NG.

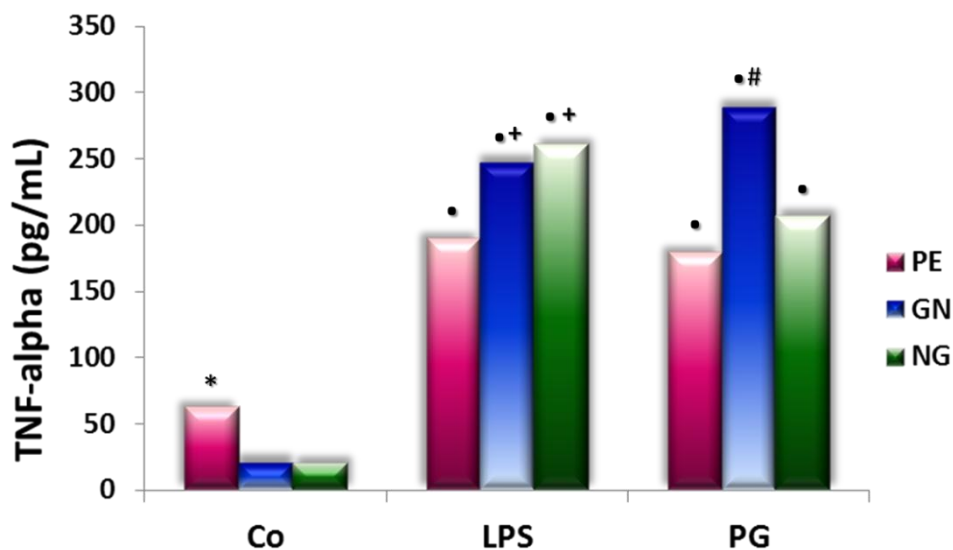


Figura 1. Concentração de TNF- α em sobrenadante de cultura de monócitos em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG). Os níveis de produção endógena (Co) e após estímulo com lipopolissacáride (LPS) e peptidoglicano (PG) foram avaliados após 18h. Os resultados foram expressos em mediana.

* ($p < 0.05$) vs Co (GN e NG); • ($p < 0.05$) vs Co (PE, GN e NG); + ($p < 0.05$) vs PE (LPS); # ($p < 0.05$) vs. PE e NG (PG) – Teste Kruskal-Wallis.

4.3. Determinação de IL-10

Gestantes normais apresentaram produção endógena significativamente mais elevada da citocina anti-inflamatória IL-10 em comparação com PE e NG.

Ao estimular os monócitos das gestantes dos três grupos com LPS e PG observaram-se níveis significativamente mais altos dessa citocina em comparação com a produção endógena. Em relação aos grupos, o com estímulo de LPS apresentou valores similares de IL-10 produzidos por monócitos. O estímulo de PG gerou uma produção significativamente mais elevada da citocina em NG quando comparada com PE e GN.

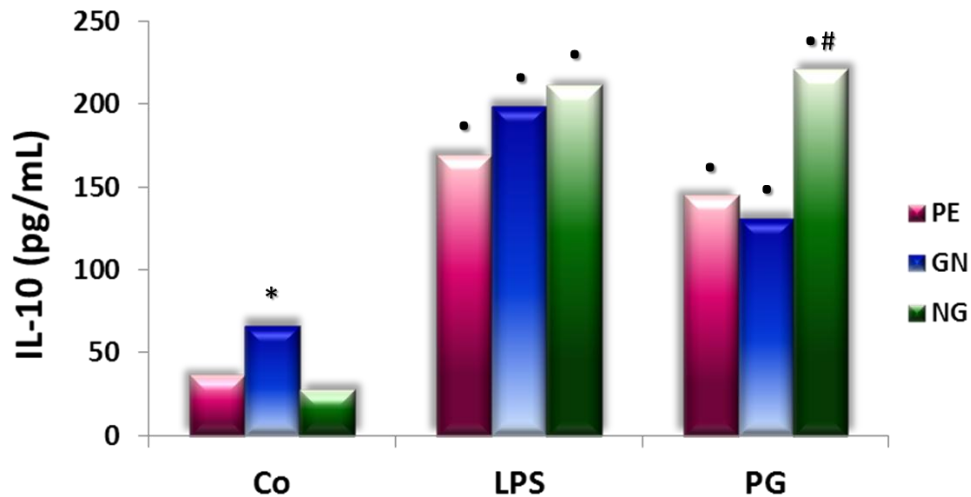


Figura 2. Concentração de IL-10 em sobrenadante de cultura de monócitos em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG). Os níveis de produção endógena (Co) e após estímulo com lipopolissacáride (LPS) e peptidoglicano (PG) foram avaliados após 18h. Os resultados foram expressos em mediana.

* ($p < 0.05$) vs Co (PE e NG); • ($p < 0.05$) vs Co (PE, GN e NG); # ($p < 0.05$) vs. PE e GN (PG) – Teste Kruskal-Wallis.

4.4. Expressão de TLR2 e TLR4

A expressão endógena de TLR2 nos monócitos não mostrou diferença estatística da média de intensidade de fluorescência (MIF) produzida pelos três grupos estudados.

Em relação à expressão de TLR4 por monócitos, foi observado que a MIF dos grupos PE e GN não diferiram estatisticamente, porém ambos os grupos mostraram valores significativamente maiores em relação às mulheres NG. No entanto, a expressão de TLR4 foi ligeiramente maior em gestantes com PE quando comparadas com GN.

Os valores encontrados na expressão de TLR4 foram significativamente elevados em relação à expressão de TLR2 por monócitos dos três grupos estudados.

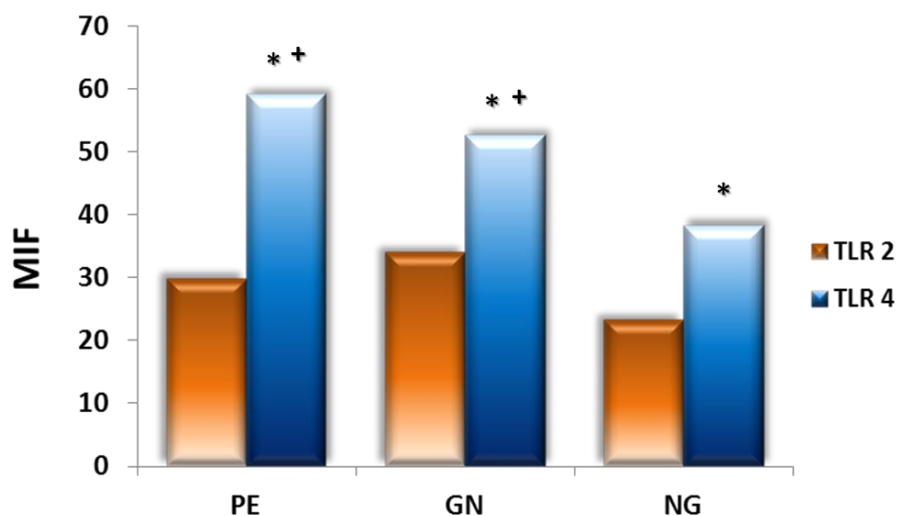


Figura 3. Média da intensidade de fluorescência (MIF) na expressão de TLR2 e TLR4 endógena de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normais (GN) e mulheres não-grávidas (NG). Os resultados foram expressos em mediana.

* ($P < 0.05$) vs TLR2 (PE, GN e NG) + ($p < 0.05$) vs TLR4 (NG) – Teste Kruskal-Wallis.

5. DISCUSSÃO

É bem discutido na literatura que monócitos podem ter papel importante na PE e os receptores TLR2 e TLR4 estão diretamente envolvidos em respostas inflamatórias de monócitos. Como a expressão desses receptores também são moduladas em trofoblastos durante a gravidez (Abrahams et al., 2005), nós hipotetizamos que a ativação de TLR2 e TLR4 pode estar altamente envolvida na PE. Portanto, o presente estudo avaliou a expressão endógena de receptores TLR2 e TLR4 e a produção da citocina inflamatória TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 em monócitos de gestantes portadoras de PE, gestantes normais e mulheres não-grávidas estimulados com LPS ou PG.

Na gestação normal observa-se uma mudança do perfil de citocinas Th-1 (inflamatório) para o perfil de citocinas Th-2 (anti-inflamatório) com predomínio de IL-10 sobre TNF- α . Na PE esse balanço encontra-se alterado com aumento de TNF- α e diminuição de IL-10 (Marzi et al, 1996).

O TNF- α é uma citocina produzida por monócitos e macrófagos que desempenha papel central na resposta inflamatória inata nos vertebrados (Varfolomeev & Ashkenazi, 2004; Sharma et al, 2007). Os nossos resultados revelaram que os monócitos de gestantes portadoras de PE tiveram uma produção endógena significativamente mais elevada de TNF- α em relação aos grupos GN e NG. Após estímulo dos monócitos com LPS, os níveis de TNF- α produzidos por células de GN e NG foram significativamente maiores quando comparados com o grupo PE. As gestantes normais também tiveram altas concentrações de TNF- α produzidas após o estímulo das células com PG quando comparadas com gestantes portadoras de PE e mulheres não-grávidas. O fato que chama a atenção é a baixa capacidade de produção de TNF- α por monócitos de gestantes com PE estimulados com LPS e PG, sugerindo um estado de exaustão das células. A tolerância à endotoxinas, um conhecido mecanismo devido à repetida exposição ao LPS que induz a dessensibilização de monócitos, parece ocorrer na PE. Beckmann et al. (2004) relataram que leucócitos de pacientes com PE apresentam produção espontânea elevada de TNF- α , indicando sua ativação pela doença, porém o estímulo dessas células com LPS induz a liberação de baixa concentração da citocina. Segundo os autores, a pré-ativação e exaustão dos leucócitos, expressa

pela liberação espontânea elevada de TNF- α poderia diminuir a resposta ao LPS. Assim, a menor capacidade de produção de TNF- α associada à ativação endógena dos leucócitos de gestantes com PE, observados no presente trabalho, sugere a instalação de um fenômeno denominado tolerância ao LPS. Classicamente, os estudos *in vitro* de tolerância ao LPS empregam baixas doses de LPS para induzir um estado de não-reatividade e desafio subsequente com concentrações elevadas de LPS (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). O estímulo *in vivo* que leva à ativação dos leucócitos em gestantes com PE, permitindo a tolerância ao estímulo com LPS, ainda não é conhecido. Entretanto, é descrito que a resposta inflamatória sistêmica exacerbada na PE pode estar associada com a liberação de substâncias com atividade inflamatória, tais como fragmentos de membranas do sincitiotrofoblasto, DNA fetal e micropartículas derivadas de leucócitos (Redman & Sargent, 2004; 2005; Lok et al., 2009).

Os níveis de IL-10 produzidos por monócitos de gestantes normais apresentaram elevada produção endógena dessa citocina. Houve uma alta produção de IL-10 nos três grupos estudados quando as células foram estimuladas com LPS e PG em relação à produção endógena. Os grupos PE e GN tiveram produção similar após estímulo com PG, porém ambos apresentaram menor produção quando comparadas com NG. Os níveis endógenos mais elevados de IL-10 produzidos por monócitos de gestantes normais sugerem a predominância de um perfil Th2 de resposta nessas pacientes, que se desenvolve durante a gestação, para minimizar os efeitos deletérios de uma resposta inflamatória excessiva. A IL-10 é responsável por suprimir a produção de citocinas inflamatórias por monócitos ativados, além de ser importante para a manutenção da gestação através da maturação de corpos lúteos (Hashii et al, 1998; Sharma et al, 2007).

No presente estudo, a maior produção de IL-10 por monócitos de gestantes normais corrobora os achados da literatura, que relatam maior produção de IL-10 em gestantes normais e queda da produção dessa citocina nas gestantes com PE (Azizieh et al., 2005; Boreckci et al., 2007). Nas gestantes normais, os níveis endógenos elevados de IL-10 sugerem um mecanismo de controle da produção de TNF- α por essas células, ao serem submetidas à estimulação crônica durante a

gestação, na tentativa de controle da reação inflamatória materna. A IL-10 exerce potente efeito anti-inflamatório, considerado importante na manutenção da gestação (Chaouat et al., 1995; Hanna et al., 2000). A menor produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico não estimuladas ou ativadas por mitógenos também foi observada na PE (Orange et al., 2003; Azizieh et al., 2005). Assim, o aumento da resposta inflamatória na PE pode ser consequente à diminuição dos níveis de IL-10, uma vez que essa citocina regula a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α por monócitos (Niho et al., 1998).

Monócitos e outras células da imunidade inata são ativados por componentes da parede celular bacteriana, após interação desses componentes com receptores TLR. Enquanto TLR4 reconhece LPS de bactérias Gram-positivas (Chow et al., 1999), TLR2 interage com peptidoglicano e ácido lipoteicoico, presentes em bactérias Gram-positivas (Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). A interação entre TLRs e componentes da parede celular, com consequente ativação das vias de sinalização intracelular leva à síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-8, bem como de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Beutler et al., 2003). O reconhecimento de endotoxinas bacterianas é mediado via TLR (Takeda & Akira, 2005). O TLR-4 reconhece o LPS e parte do complexo-chave de sinalização compreende CD14, MD-2 e componentes intracelulares que iniciam a resposta imune protetora contra patógenos (Fitzgerald et al., 2004). O LPS possui uma potencial importância na ativação da resposta inflamatória. Baixas doses de LPS induzem ratas prenhas à mudanças patológicas similares às observadas na PE (Faas et al., 1994). Estas observações sugerem que indutores inflamatórios sistêmicos como o LPS, através da sinalização via TLR4, pode estar patologicamente ligado ao desenvolvimento e progressão da PE (Xie et al., 2009).

Na PE, Mazouni et al. (2008) avaliaram a produção de TNF- α e IL-10 por monócitos estimulados com PG e LPS, ligantes de TLR2 e TLR4 respectivamente. Observaram que a produção de TNF- α estava significativamente diminuída na PE, enquanto a de IL-10 não foi afetada. Em modelo ex vivo, empregando células sanguíneas humanas, Hadley et al. (2005) observaram sinergismo entre LPS e PG na liberação das citocinas TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-10, sendo o efeito sinérgico precedido por aumento da expressão de TLR2 e TLR4 induzido por esses dois componentes da parede celular bacteriana. Segundo os autores, LPS e PG podem

também estimular a expressão de TLR2, TLR4 e CD14 após a interação com as células.

A média de intensidade de fluorescência da expressão endógena de TLR4 nas mulheres pré-eclâmpticas foi significativamente maior em relação aos grupos GN e NG. As grávidas normais demonstraram uma expressão altamente significativa quando comparada com mulheres não-grávidas. No entanto, a expressão por monócitos de TLR2 não teve diferença estatística entre os grupos estudados.

Os resultados do presente trabalho, em concordância com a literatura, sugerem que a produção de TNF- α e IL-10 por monócitos de gestantes normais e com PE, após estímulo com LPS e PG pode ser dependente da interação desses componentes com TLR4 e TLR2. A menor capacidade de produção de TNF- α pelos monócitos de gestantes com PE após estímulo com os agonistas de TLR2 e TLR4 pode ser atribuída à ativação sistêmica *in vivo*, causada por substâncias com atividade inflamatória liberada no plasma dessas pacientes (Redman & Sargent, 2004).

Recentes trabalhos têm evidenciado que TLR desempenham importantes atividades nas complicações da gestação, especialmente na PE. A partir de evidências que suportam a teoria que a ativação de TLR contribui para o desenvolvimento e progressão da doença, nosso trabalho mostrou a forte ligação entre a patologia da PE e a imunidade dessas pacientes, ressaltando a participação de TLR4 na produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e o papel de citocinas anti-inflamatórias na complicação da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*, 6ª ed, Rio de Janeiro – RJ: Elsevier Editora Ltda, 2008. p.267-301.
- Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2004; 51(4): 275–82.
- ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). *Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia*. ACOG Practice Bulletin no. 33. Washington, DC.: ACOG; 2002.
- Aneja RK, Tsung A, Sjodin H, Geffer JV, Delude RL, Billiar TR, Fink MP. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance. *J Leukoc Biol*. 2008; 84:1326-1334.
- Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 54: 30-7.
- 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.
- Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol*. 2003; 74(4):479-85.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11(5): 309-16.
- Borekci B, Aksoy H, Al RA, Demircan B, Kadanali S. Maternal serum interleukin-10, interleukin-2 and interleukin-6 in pre-eclampsia and eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 58:56-64.
- Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest*. 1968; 97: 77-89.
- Carty DM, Delles C, Dominiczak AF. Preeclampsia and future maternal health. *J Hypertens*. 2010; 28: 1349-55.
- Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-g. *J Immunol*. 1995; 154:4261-68.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 1999; 274:10689-10692.
- Dekker GA, Sibai BM. The immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol*. 1999; 23(1):24-33.
- Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in perinatology*. 2009; 33(3): 130-7.

- 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.
- 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.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Golenbock DT. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect*. 2004; 6(15):1361-7.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury JF, Sharma S. Gestational age-dependent expression of interleukin-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J. Immunol*. 2000; 164:5721–28.
- Hashii K, Fujiwara H, Yoshioka S, Kataoka N; Yamada S; Hirano T; Mori T; Fuji S; Maeda M. Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and nonpregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation. *Hum Reprod*. 1998; 13:2738.
- Huppertz B; Kingdom J; Caniggia I; Desoye G, Black S; Korr H; Kaufmann P. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta*. 2003; 24(2-3):181–90.
- 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.
- 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.
- 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.
- Koga K; Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2008; 15(3):231-42.
- Krutzik SR; 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 S; 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.
- 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.
- Levine RJ, Lam C; Qian C; Yu K.; Maynard SE; Sachs BP. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006; 355(10):992-1005.
- Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A, Van Der Post JA. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2009; 61:346-59.
- Lu YC; Yeh WC; Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42: 145-51.
- Luppi P; Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.* 2006; 118(2-3):268-75.
- 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.
- Marzi M; Viganò A; Trabattoni D; Villa ML; Salvaggio A; Clerici E; Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy." *Clin ex immunol.* 1996; 106(1): 127-33.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002; 296 (5566): 301-5.
- Mazouni C; Capo C; Ledu R; Honstetterre 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.; Charles A; Janeway J. 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.
- NHBPEP (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.
- Niho Y, Niiro H, Tanaka Y, Nakashima H, Otsuka T. Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. *Acta Haematol.* 1998; 99(3):165-70.
- Okamura, Y.; Watari, M.; Jerud, E.S.; Young, D.W.; Ishizaka, S.T.; Rose, J.; Chow, J.C.; Strauss, J.F. 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001; 276(13): 10229-33.
- Orange S, Horvath J, Hennessy A. Preeclampsia is associated with a reduced interleukin-10 production from peripheral blood mononuclear cells. *Hypertens Pregnancy.* 2003;22(1):1-8.
- 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.
- Peraçoli JC; Rudge MVC; Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2007; 57(3):177-85.
- Peraçoli MTS; Menegon FT; Borges VTM; de Araújo Costa RA; Thomazini-Santos IA; Peraçoli JC. Platelet aggregation and TGF-beta1 plasma levels in pregnant women with preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2008; 79(1):79-84.
- Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased Reactive Oxygen Species and Tumor Necrosis Factor-Alpha Production by Monocytes are Associated with Elevated Levels of Uric Acid in Pre-Eclamptic Women. *Am J Reprod Immunol.* 2011; doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01016.x.
- 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.
- 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.
- 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 et al. Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro. *Cytokine*. 2003; 23(4-5):119-25.
- 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.
- Sacks GP; Redman CW; Sargent IL. Monocytes are primed to produce the Th1 type cytokine IL-12 in normal human pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*. 2003; 131(3):490-7.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*. 1999; 274(25): 17406-9.
- Schuiling GA; Koiter TR; Faas MM. Why pre-eclampsia? *Hum Reprod*. 1997;12(10):2087-91.
- Sharma A; Satyam A; Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58(1): 21-30.
- 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.
- Takeda K; Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Internat immunol*. 2005; 17(1): 1-14.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999; 11(4):443-51.

- Uzan J; Carbonnel M; Piconne O; Asmar R; Ayoubi, J-marc. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis and management. *Vascular Health And Risk Management*. 2011;467-474.
- Varfolomeev EE; Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JunKie? *Cell*. 2004; 116:491–497.
- 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.
- 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.
- Xie F, Hu Y, Turvey SE, Magee LA, Brunham RM, Choi KC, Kraiden 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.