

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/02/2022.



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

Virgínia Juliani Gomes

**Envolvimento de urato monossódico e silibinina na
modulação de monócitos de gestantes portadoras
de pré-eclâmpsia**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Coorientadora: Dra. Mariana Romão Veiga

**Botucatu
2020**

Virgínia Juliani Gomes

**Envolvimento de urato monossódico e silibinina na
modulação de monócitos de gestantes portadoras
de pré-eclâmpsia**

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

Orientadora: Profa.Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Coorientadora: Dra. Mariana Romão Veiga

Botucatu
2020

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

Gomes, Virgínia Juliani.

Envolvimento de urato monossódico e silibinina na modulação de monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Virgínia Juliani Gomes. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

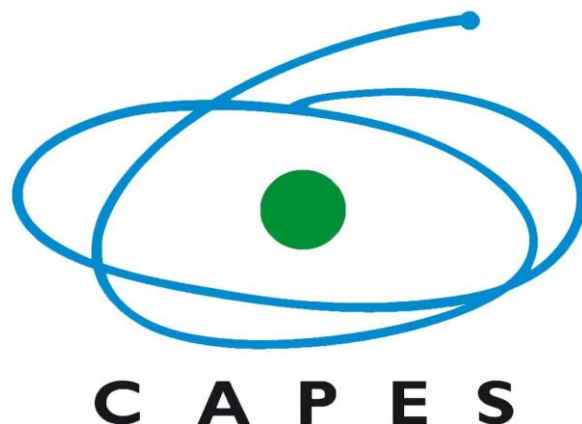
Coorientador: Mariana Romão Veiga

Capes: 21104000

1. Gestantes. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Ácido Úrico.
4. Silibina. 5. Monócitos.

Palavras-chave: Imunomodulação; Monócitos; Pré-eclâmpsia; Silibinina; Urato monossódico.

Financiamento:



Bolsa CAPES – Mestrado
Período de vigência: março/2018 - abril/2018



Bolsa FAPESP – Mestrado
Período de vigência: maio/2018 - fevereiro/2020
Processo n° 2017/26053-4

Bolsa de Ensino e Pesquisa no Exterior (BEPE)
Período de vigência: junho/2019 - setembro/2019
Processo n° 2019/10250-0

Auxílio regular à Pesquisa
Período de vigência: fevereiro/2017 - julho/2019
Processo n° 2016/18155-9

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família.

Essas páginas são dedicadas especialmente aos meus pais, Marcos e Luciana. Tenho o privilégio de ser fruto de uma linda relação de amor e companheirismo que me inspira todos os dias. Por muitas vezes, durante esses dois anos de mestrado, me amparei na compreensão de minha mãe e me impulsionei nos incentivos de meu pai. Sou grata por esses momentos e por todos os sacrifícios por parte deles, realizados em meu benefício. Tenho orgulho de ser filha de pessoas tão íntegras e de bom coração.

Agradecimientos

Agradecimento Especial

À minha orientadora Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por abrir a porta de seu laboratório a uma insistente graduanda em Ciências Biomédicas que se interessou por sua linha de estudo em 2016. Graças a essa oportunidade, descobri um grande encanto pela pesquisa. Nosso convívio me inspira a ser uma profissional dedicada, generosa e competente como ela. Agradeço por investir seu tempo e atenção em mim, por me apoiar na decisão maluca de solicitar uma bolsa de ensino e pesquisa no exterior com uma margem de tempo tão curta e por se preocupar com meu desenvolvimento e bem-estar. Sentirei muita falta de nossos cafézinhos adoçados com discussões sobre meu projeto e conselhos de vida.

Agradecimentos

A Deus, que mesmo em minhas fases mais negligentes em relação à Ele, acalmou minhas angústias e iluminou meus caminhos.

Aos meus avós paternos, Ademar e Zelinda, e maternos, Luiz e Teresa, alicerces de minha família e de minha criação. Obrigada por todo cuidado e carinho que estão impressos em minha memória em forma de roupas de boneca bordadas a mão e pastel toda sexta-feira.

Aos meus irmãos, Gabriel e Gustavo, os primeiros a me ensinar a dividir e trabalhar em grupo. As melhores risadas são as que se iniciam sem motivo quando estou com vocês.

Aos meus tios Daniela, Luciano e Fernando por se fazerem sempre presentes em minha vida, me apoiando e prestigiando.

Às minhas primas, Chiara e Olívia, por todas as lembranças de minha infância construídas junto delas. E à minha prima Gabriela, por nos permitir reviver todas essas brincadeiras e risadas como se não tivéssemos crescido.

Ao meu namorado Renan, por toda a compreensão e companheirismo durante essa etapa. Obrigada por acreditar em meu potencial, principalmente quando tenho dificuldade em fazer o mesmo, e me incentivar a ir sempre mais longe. Nosso convívio me faz uma pessoa melhor.

Aos meus familiares Marques, Juliani, Costa e Gomes que, mesmo quando não acompanham de perto, vibram com minhas conquistas.

Às minhas amigas de laboratório, por cada lição aprendida, cada risada dada e cada desespero superado. À Mariana Romão, minha coorientadora, por todos os e-mails respondidos com paciência, ensinamentos técnicos e correções construtivas. À Mariana Matias, que me fez rir tanto quanto me ensinou sobre silibinina, ácido úrico e inflamassomas. À Vanessa, por toda a disponibilidade e ajuda com burocracias e telefonemas quando eu não fazia ideia do que fazer. À Priscila, por me incentivar a encarar a BEPE e ser minha parceira

nessa aventura. E finalmente à Amanda, minha companheira de mestrado, por todas as amostras coletadas, frustrações com a técnica de citometria de fluxo divididas e caronas dadas durante esses dois anos. Obrigada por me acompanharem nessa jornada, tornando-a mais leve e prazerosa! Sentirei falta de todas no meu dia-a-dia!

Ao Dr. José Carlos Peraçoli, por selecionar cuidadosamente as pacientes para esse trabalho e por dividir conosco nossa querida “Tizinha”.

Às minhas amigas de faculdade: Alessandra (Piga), Aline (Crau), Ana Carolina (Joinha), Carolina (Gudão), Isabela (Pole), Júlia (Seri), Juliana (Ellen) e Natália (Saibro), por transformarem Botucatu em minha segunda casa e tornar a graduação um dos trechos mais especiais de minha história.

Aos meus amigos Leonardo (Hemo) e Priscila (Bê), por todas as vezes que demonstraram fé em mim e alegria com minhas conquistas.

Aos meus amigos da Escola Internacional de Alphaville: Adriana, Caio, Isabel, Isabella e Julia pela amizade que completa dez anos. Quando nos encontramos é como se o tempo não tivesse passado.

À Graça, por seu cuidado e dedicação à minha família durante todos esses anos.

À Socorro, minha “Vó 3”, e seu esposo Djair, por todo carinho e votos de sucesso.

À Dr^a. Graziela Romagnoli, pelo auxílio em relação à técnica de citometria de fluxo e por disponibilizar do seu tempo para contribuir com esse trabalho.

Ao Professor Dr. Mattias Carlstrom e todo seu grupo de pesquisa, do Instituto Karolinska, por aceitarem me receber em seu laboratório e desenvolver um projeto em colaboração conosco. Serei eternamente grata pela receptividade e confiança que me proporcionaram essa incrível experiência.

À Dr^a. Larissa Ragozo, por sua prontidão em contribuir com nosso estudo, pela boa conversa e por seu delicioso chá de gengibre.

Aos docentes, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela boa convivência e momentos de descontração na copa do Depto.

Aos funcionários do ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia, sempre prontos a ajudar e orientar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, por possibilitar a realização deste trabalho e aos funcionários, em especial à Solange Cagliari, pela disponibilidade e eficiência demonstrados quando necessário.

Às doadoras voluntárias que aceitaram participar desse trabalho, pois sem elas nada disso seria possível.

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

Prefácio

A dissertação intitulada “Envolvimento de urato monossódico e silibinina na modulação de monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia” encontra-se dividida em três capítulos.

Primeiramente, o capítulo I traz uma breve revisão de literatura a respeito da patogênese da pré-eclâmpsia e suas manifestações clínicas. Essas páginas abordam a classificação das subpopulações de células da linhagem monocítica-macrofágica e a importância de uma polarização macrofágica adequada para o desenvolvimento de uma gestação saudável. Também são rapidamente apresentados o papel de cristais de ácido úrico (urato monossódico) no desencadeamento da inflamação estéril presente nessa doença e as propriedades da silibinina, que explicam seu grande potencial como imunomodulador de monócitos.

O capítulo II apresenta o manuscrito “*Silibinin induces in vitro polarization of monocytes from preeclamptic women to M2 profile*” fruto do projeto de mestrado da aluna. Nesse trabalho, relatamos que o tratamento *in vitro* de monócitos de mulheres portadoras de pré-eclâmpsia com silibinina polariza as células para o perfil M2, sugerindo que esse flavonoide tem um efeito imunomodulador sobre a inflamação estéril característica da pré-eclâmpsia.

O capítulo III é composto por estudo desenvolvido durante o período de Bolsa de Ensino e Pesquisa no Exterior (BEPE-FAPESP) em parceria com o Instituto Karolinska (Suécia). O manuscrito intitulado “*Silibinin attenuates preeclampsia-derived monocytes-induced oxidative stress in human endothelial cells*” reafirma que a pré-eclâmpsia está associada com estresse oxidativo e disfunção endotelial, além de sugerir que o tratamento de monócitos com silibinina é capaz de reduzir a peroxidação lipídica, apesar de não influenciar na via de sinalização do óxido nítrico em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC).

Fluxograma dos Experimentos

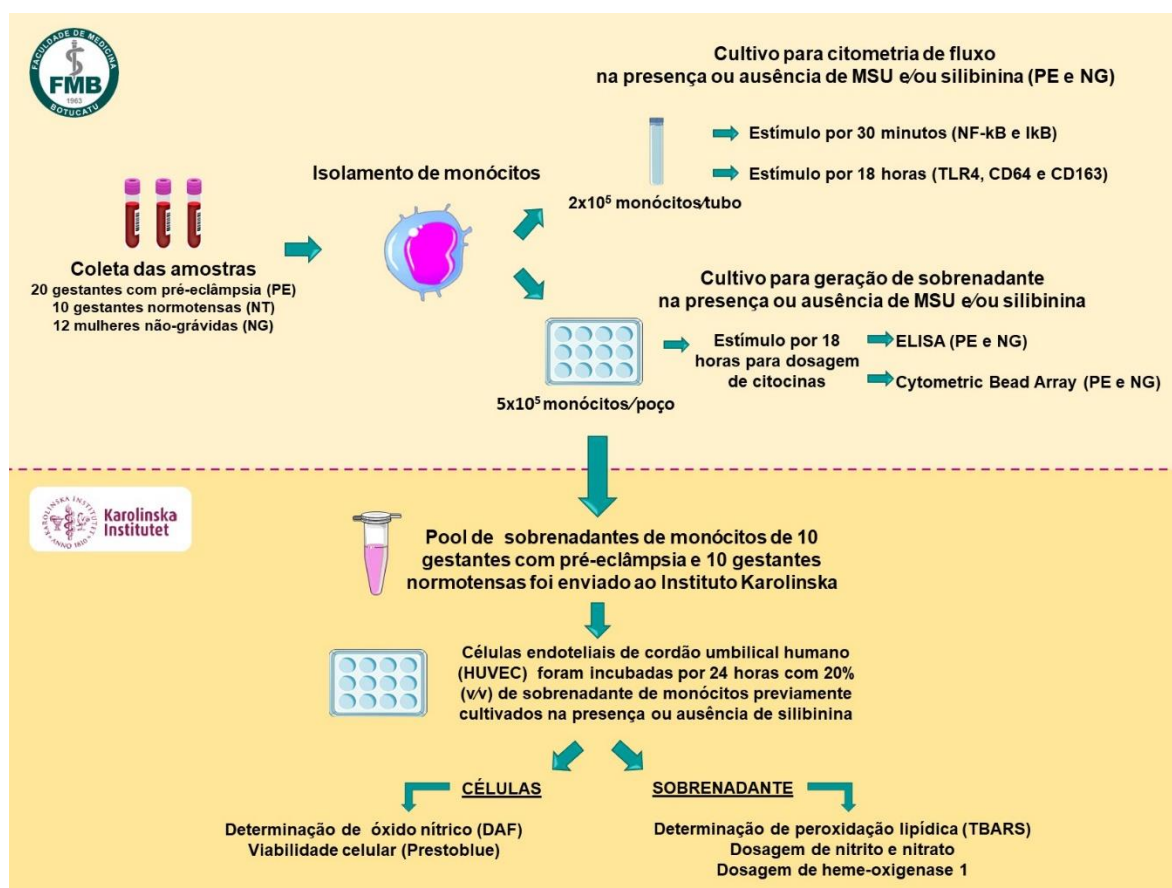


Figura 1. Fluxograma de experimentos sintetizando as etapas realizadas no Laboratório de Imunologia da Reprodução da UNESP (Botucatu, Brasil) e no período de Bolsa de Ensino e Pesquisa no Exterior (BEPE-FAPESP) no Instituto Karolinska (Estocolmo, Suécia).

Lista de abreviaturas

APC: fluorocromo alofococianina

ARE: *antioxidant response element*

ANOVA: análise de variância

BSA: albumina do soro bovino

CD: *cluster of differentiation*

CD14: *cluster of differentiation 14*

CD16: *cluster of differentiation 16*

CD163: *cluster of differentiation 163*

CD206: *cluster of differentiation 206*

CD32: *cluster of differentiation 32*

CD64: *cluster of differentiation 64*

Co: grupo controle

DAMPs: padrões moleculares associados ao dano

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

FcγR: receptores opsonínicos

FL: fluorescência

FSC: *forward scatter*, parâmetro de tamanho

°C: graus Celsius

GM-CSF: fator estimulador de colônia de granulócito macrófago

HMGB1: *High Mobility Group Box 1*

HO-1: hemeoxigenase-1

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

Hsp: proteína de choque térmico

HUVEC: células endoteliais de cordão umbilical humano

IFN- γ : interferon gama

IgG: imunoglobulina G

IKK: I κ B quinase

I κ B: proteína inibitória da via de sinalização de NF- κ B

IL: interleucina

LPS: lipopolissacarídeo

M1: monócitos classicamente ativados

M2: monócitos alternativamente ativados

MDA: *malondialdehyde*

MFI: média de intensidade de fluorescência

min: minutos

MSU: urato monossódico

NLRP: *NOD-like receptor with a pyrin domain*

NF- κ B: *nuclear factor kappa B*

Nfr2: *nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*

NG: não-grávida

NP: *non-pregnant* (não-grávida)

NT: gestantes normotensas

O $_2^{\cdot-}$: ânion superóxido

ONOO $^{\cdot-}$: peróxido de nitrito

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PBMCs: Células mononucleares do sangue periférico

PBS: solução salina tamponada (*phosphate buffered saline*)

PE: pré-eclâmpsia

PE-Cy 7: *phycoerythrin-Cy 7*

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

PRRs: receptores de reconhecimento de padrão

ROS: espécies reativas de oxigênio

rpm: rotações por minuto

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

Sb: silibinina

sCD163: receptor CD163 solúvel

SSC: *side scatter* - parâmetro de granularidade

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TGF- β 1: fator transformador do crescimento beta 1

Th1: célula T helper 1

Th2: célula T helper 2

TLRs: receptores *Toll*

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UA: ácido úrico

Lista de símbolos

g: gramas

mg: miligramas

mL: mililitro

mm: milímetro

mmHg: milímetro de mercúrio

***p*:** nível de significância

pg: picograma

U/mL: unidade por mL

μ g: micrograma

μ L: microlitro

Sumário

Capítulo I	19
Capítulo II	41
Capítulo III	73

Capítulo 1

Pré-eclâmpsia

A gestação normal é caracterizada por resposta inflamatória sistêmica leve, resultante da ativação da imunidade inata, que atua como mecanismo protetor do organismo materno contra infecções, uma vez que a reatividade da resposta imune específica se encontra ligeiramente diminuída (Wegmann et al., 1993; Borzychowski et al., 2006). A adaptação materna à gestação requer uma interação proeminente e rigidamente controlada entre as imunidades inata e adaptativa, para permitir o crescimento e desenvolvimento normais do semi-enxerto fetal (Van Rijn et al., 2008).

A pré-eclâmpsia (PE) é considerada uma síndrome específica da gravidez, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade em 2 a 10% das gestações (ACOG, 2019). Os parâmetros clínicos que identificam o aparecimento dessa patologia são hipertensão arterial (PA $\geq$ 140 x 90 mmHg) associada ou não à proteinúria ($\geq$ 300 mg/24h) a partir da vigésima semana de gestação ou após o parto, em mulheres previamente normotensas. Outras disfunções maternas também estão relacionadas com PE, como insuficiência renal, comprometimento hepático, complicações neurológicas ou hematológicas, disfunção útero-placentária ou restrição de crescimento fetal (Tranquilli et al., 2014; Mol et al., 2016; ACOG, 2019).

A PE caracteriza-se por intensa reação inflamatória sistêmica, lesão endotelial, agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação e aumento da resistência vascular generalizada (Roberts, 1998; Borzychowski et al., 2006), que parecem contribuir significativamente para a fisiopatologia da doença (Redman & Sargent, 2005). Assim, na PE observam-se ativação endógena de células inflamatórias como monócitos, granulócitos e células endoteliais (Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006; Peraçoli et al., 2011), produção excessiva das citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, interferon-gama (IFN- γ)

e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007; Pinheiro et al., 2013; Raghupathy, 2013), bem como por deficiência na produção de citocinas reguladoras, como IL-10 (Cristofalo et al., 2013; Peraçoli et al., 2013; Aggarwal et al., 2019).

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 (Lok et al., 2009). Este distúrbio imunológico parece ter sua origem na placenta, resultante de lesão tecidual causada por isquemia/hipóxia, decorrente da falha de invasão das artérias uterinas pelo trofoblasto fetal (Huppertz, 2008). A diminuição da oferta local de oxigênio e nutrientes está associada à morte celular aumentada do trofoblasto (Wu et al., 2012), que pode resultar na liberação de mediadores de inflamação sistêmica materna como IL-6 e TNF- α , aumentando a expressão de moléculas de adesão e disfunção endotelial e contribuindo para a patogênese da PE (Kharfi et al., 2003; Harmon et al., 2016). Esses mediadores, liberados após necrose do trofoblasto (Huppertz et al., 2003) incluem DNA fetal, ácido úrico, *High Mobility Group Box 1* (HMGB1), produtos de matriz extracelular, IL-1 α entre outros, caem na circulação materna e podem interagir com leucócitos circulantes, contribuindo para a intensa resposta inflamatória sistêmica, descrita na PE (Redman & Sargent, 2003). Monócitos de gestantes pré-eclâmpicas apresentam-se endogenamente ativados e liberam concentrações significativamente elevadas de TNF- α , IL-1 β , IL-18, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Peraçoli et al., 2011, Cristofalo et al., 2013; Matias et al., 2015). Esses resultados confirmam que a PE é caracterizada por estresse oxidativo e que monócitos circulantes podem representar importante fonte de radicais livres e citocinas inflamatórias nessa patologia. Assim, a resposta inflamatória sistêmica exacerbada, que na PE geralmente ocorre na ausência de infecção microbiana, tem sido descrita como inflamação estéril (Nadeau-Vallée et al., 2016; Brien et al.,

2018). Evidências da participação de monócitos nesse tipo de inflamação são representadas pela expressão gênica e proteica dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 associada à produção exacerbada de IL-1 β , IL-18 e TNF- α por essas células, em gestantes portadoras de PE, que não apresentam sinais ou sintomas de infecção microbiana (Matias et al., 2015; 2019; Romão-Veiga et al., 2018).

Linhagem monocítica-macrofágica

Monócitos e macrófagos são importantes células da imunidade inata cujo processo de ativação está intimamente associado ao desenvolvimento da PE (Faas et al., 2014; Vishnyakova et al., 2019). Embora o mecanismo de ativação de monócitos na PE ainda não esteja totalmente esclarecido, uma possível explicação parece estar relacionada ao fato de que monócitos maternos são ativados durante sua passagem pela placenta, uma vez que estabelecem contato com citocinas e fatores inflamatórios produzidos pelo sinciciotrofoblasto (Weel et al., 2016; Nonn et al., 2019). Citocinas, microvesículas e exossomos são liberados pelo sinciciotrofoblasto no sangue materno e podem manter o estado de ativação dessas células (Sokolov et al., 2016).

Uma vez infiltrados nos tecidos, monócitos se diferenciam em macrófagos, sendo seus precursores (Gordon & Taylor, 2005). Essas células estão envolvidas em vários processos como fagocitose, imunidade inata e adaptativa, atividade pró- e anti-inflamatória e, dependendo do microambiente tecidual onde se encontram, podem ser classificadas em duas principais subpopulações celulares que se adaptam e respondem à uma grande variedade de sinais: M1 ou classicamente ativados e M2 ou alternativamente ativados (Mantovani et al., 2004; 2013, Jena et al., 2019). O estado de ativação e função dessas células são marcadamente afetados por diferentes citocinas e produtos microbianos denominados padrões

moleculares associados a patógenos (PAMPs). Além disso, produtos endógenos liberados durante lesão tecidual, considerados padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs), ativam células da imunidade inata, promovendo a orientação da resposta imune adaptativa para perfil Th1 ou Th2, bem como expressão de funções efetoras especializadas e polarizadas (Mosser, 2003; Gordon & Martinez, 2010; Martin et al., 2011; Mantovani & Locati., 2013; Tian et al., 2015). Segundo Mantovani et al. (2004) a classificação M1 e M2 refere-se, portanto, a dois extremos de um espectro de ativação de macrófagos. Assim, macrófagos são células com plasticidade porque podem mudar de um estado ativado M1 para M2 ou regulador e vice-versa, sob efeitos de sinais específicos do ambiente onde se encontram (Porcheray et al., 2005; Bouhel et al., 2007; Tarique et al., 2015).

Essas células polarizadas diferem entre si pela expressão de receptores, produção de citocinas e funções efetoras. Células com perfil M1, decorrente da ativação por IFN- γ , TNF- α ou lipopolissacáride (LPS), expressam receptores opsonínicos do tipo Fc γ RI, II ou III (CD64, CD32, CD16), receptores TLR2 e TLR4 e produzem citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IL-23, além de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (Mantovani et al., 2004; Sica et al., 2009). Por outro lado, macrófagos ativados por IL-4 e IL-13 polarizam para perfil M2, que são caracterizado por maior expressão de receptores CD163 “scavenger” para complexos haptoglobina-hemoglobina (Kristiansen et al. 2001), possui propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias (Zuwala-Jagiello, 2006; Akila et al., 2012) e receptor de manose (CD206), além de maior produção de IL-10, TGF- β 1 e Arginase 1 (Mantovani et al., 2004; Malyshev & Malyshev, 2015).

Na interface materno-fetal, macrófagos estão presentes em todos os estágios da gestação e envolvidos em várias atividades, incluindo regulação da resposta imune, decidualização, invasão celular da placenta,

angiogênese, trabalho de parto e involução uterina pós-parto. O estado de ativação e função dessas células dependem do microambiente tecidual onde se encontram (Zhang et al., 2017). Numa gestação saudável, macrófagos da decídua se encontram inicialmente polarizados para o perfil M1, secretando citocinas e fatores de crescimento que auxiliam na implantação (Mor et al., 2011). Durante o segundo e terceiro trimestre de gestação, o perfil anti-inflamatório M2 prevalece, favorecendo a tolerância ao feto e permitindo seu crescimento no organismo materno (Svensson-Arvelund et al., 2014). Com a aproximação do momento do parto ocorre o desvio para o perfil M1, contribuindo para contração uterina e direcionamento do feto (Hamilton et al., 2012). A polarização macrofágica adequada e cronologicamente regulada é essencial para o desenvolvimento de uma gestação saudável (Figura 2) (Zhang et al., 2017; Vishnyakova et al., 2019). Sargent et al. (2006) sugerem que a transição para o perfil M2 durante o segundo trimestre de gestação estaria bloqueada na PE.

Estudos mostram que a classificação de macrófagos M1 e M2 pode ser estendida para monócitos do sangue periférico de pacientes com sepsis (Groselj-Grene et al., 2008), diabetes tipo 2 (Satoh et al., 2010), ou doenças autoimunes. O aumento da expressão de CD64 em monócitos de pacientes com lúpus eritematoso é considerado um marcador de atividade da doença (Kikuchi-Taura et al., 2015). Por outro lado, na leishmaniose cutânea, monócitos circulantes e macrófagos presentes nas lesões estão polarizados para o fenótipo M2. O tratamento quimioterápico nessa doença foi efetivo para restaurar o balanço M1/M2, importante para eliminar a infecção (Mukhopadhyay et al., 2015).

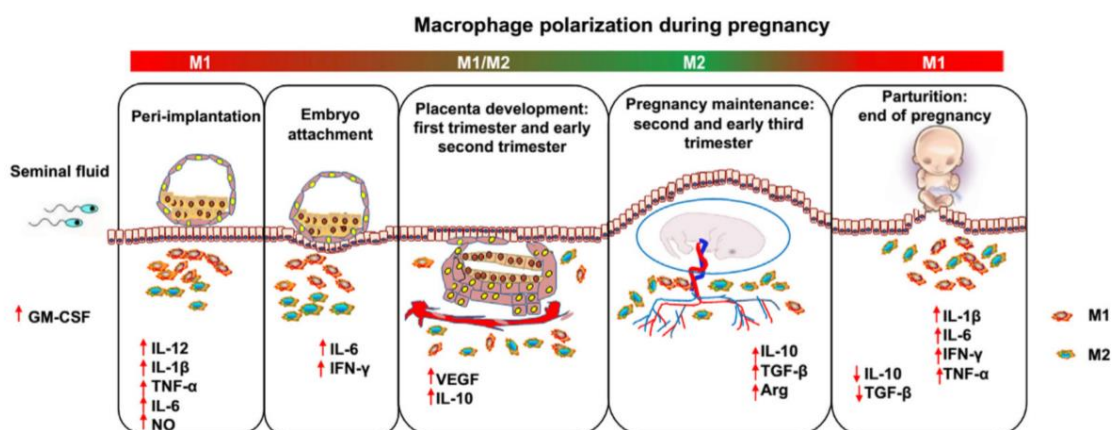


Figura 2. Dinâmica entre células M1 e M2 durante a gestação saudável. Logo após o coito, os níveis do fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) são aumentados pela presença de TGF-β no fluido seminal, promovendo polarização para o perfil M1. Durante o período de implantação, macrófagos M1 produzem citocinas inflamatórias e mediadores químicos, como IL-6, IL-1β, TNF-α e óxido nítrico, auxiliando na implantação do embrião à decídua e no remodelamento vascular. Posteriormente, maiores níveis de progesterona são produzidos a fim de permitir o desenvolvimento fetal. Dessa forma, é estabelecido no útero um ambiente M2-dominante, apresentando menores concentrações de mediadores inflamatórios, maior produção de citocinas anti-inflamatórias e fagocitose de debris apoptóticos. Por fim, durante o período de parturição macrófagos M1 predominam sobre o perfil M2, promovendo a contração uterina, expulsão do bebê, ejeção da placenta e involução uterina (Figura adaptada de Zhang et al., 2017).

Em estudo prévio de nosso grupo, demonstramos que monócitos do sangue periférico de gestantes portadoras de PE estão endogenamente ativados e polarizados para perfil M1, com aumento na expressão de receptores TLR4 e CD64, diminuição de receptores CD163 e CD206 e produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Medeiros et al., 2014). Além disso, em trabalho recente detectamos menor expressão do receptor CD163 em monócitos de gestantes com PE grave, associada à diminuição dos níveis plasmáticos da forma solúvel (sCD163) desse receptor e de IL-10. Paralelamente, a concentração plasmática das citocinas inflamatórias IL-1β e TNF-α foi significativamente mais elevada nessas gestantes e se correlacionou negativamente com os valores de sCD163. A associação

entre o perfil de citocinas pró-inflamatórias e a menor concentração de sCD163 e IL-10 no plasma das gestantes com PE grave sugere a ocorrência de um defeito na regulação da resposta inflamatória sistêmica na PE (Nunes et al., 2019).

Considerando que monócitos apresentam meia-vida de poucos dias na circulação sanguínea, suas concentrações e características fenotípicas podem ser consideradas um reflexo da gravidade do quadro da paciente com PE, sugerindo que o monitoramento desses fatores possui valor como teste de triagem e acompanhamento da doença (Vishnyakova et al., 2019). Devido a sua alta plasticidade, é possível que monócitos mudem de um estado ativado M1 para outro regulador M2 e vice-versa, dependendo dos sinais específicos presentes na circulação materna (Tarique et al., 2015; Zhang et al., 2017). Nesse sentido, a reprogramação dessas células pode se apresentar como interessante estratégia terapêutica para diversas doenças (Mantovani & Allavena, 2015). Dessa forma, a administração de moléculas moduladoras de monócitos pode vir a contribuir para a regulação do desbalanço da resposta inflamatória presente na PE.

Pré-eclâmpsia, hiperuricemia e silibinina

Em muitas pacientes com PE observam-se concentrações plasmáticas elevadas de ácido úrico, que se correlacionam com aumento da produção de TNF- α e de ânion superóxido por monócitos do sangue periférico (Peraçoli et al., 2011) e estão associadas com proteínas de choque térmico Hsp70 e citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-12 e TNF- α (Peraçoli et al., 2013). A hiperuricemia está associada à gravidade da PE (Martin & Brown, 2010) e, portanto, considera-se que altos níveis de ácido úrico no plasma de gestantes pré-eclâmpticas podem representar uma contribuição direta à patogênese da doença pelo seu potencial de promover

inflamação (Bainbridge & Roberts, 2008).

O ácido úrico, sob a forma de cristais de urato monossódico (MSU) é considerado molécula pertencente ao grupo das DAMPs e pode se ligar aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos em células da imunidade inata, envolvidas na resposta inflamatória de monócitos (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Dentre esses receptores destacam-se os receptores semelhantes a *Toll* (TLRs), que reconhecem e ligam-se a DAMPs (Kim et al., 2005) e PAMPs (Koga & Mor, 2008). Martin et al., (2011), estudando modelo murino para gota, observaram que cristais de MSU induzem a diferenciação de monócitos não-inflamatórios em macrófagos com perfil M1 de ativação. Além disso, MSU é ainda capaz de se ligar ao receptor TLR4, aumentando significativamente a expressão dessa molécula, NLRP3, IL-1 β , CD40 e HLA-DR em células mesangiais renais (Xiao et al., 2015). Em trabalhos anteriores demonstramos que monócitos de gestantes portadoras de PE estimulados ou não com MSU apresentam ativação do inflamassoma NLRP3, da via TLR4/NF- κ B e maior produção de IL-1 β , IL-18 e TNF- α (Matias et al., 2015; 2019). O receptor NLRP3 é descrito como sensor de ácido úrico que induz a produção de IL-1 β em linhagem celular de trofoblasto. Assim, a hiperuricemia associada à PE pode estar relacionada à ativação do inflamassoma NLRP3 no trofoblasto, aumentando assim os níveis de IL-1 β na placenta e contribuindo para a patogênese da PE (Mulla et al., 2011).

A interação das DAMPs com os receptores TLRs induz resposta inflamatória pela via de sinalização do fator de transcrição nuclear NF- κ B, uma proteína composta por duas subunidades a p50 e a p65, capaz de se ligar ao DNA e agir como um fator de transcrição em vários genes envolvidos nos processos inflamatórios, citoprotetores e carcinogênicos (Kang et al., 2002; Manna et al., 1999; Bannwart et al., 2010a; Raina et al., 2013). Em células não estimuladas, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a proteínas inibitórias da família I-kappaB (I κ B). Após o

reconhecimento das DAMPs pelos receptores, inicia-se um processo de fosforilação dependente da kinase – IKK, que pode ser do tipo: IKK α , IKK β e IKK γ ou NEMO, seguido por uma degradação de I κ B (Akira et al., 2001). Uma vez fosforilada, a I κ B é poliubiquitinizada e rapidamente degradada pelo proteassoma, dissociando então o heterodímero p50/p65. Isso permite que o NF- κ B migre para o núcleo e ligue-se à região promotora de genes que apresentam a sequência regulatória GGGACTTTCC, levando a um aumento da expressão do gene alvo (Lu & Wahl, 2005; Echeverri & Mockus, 2008) (Figura 3).

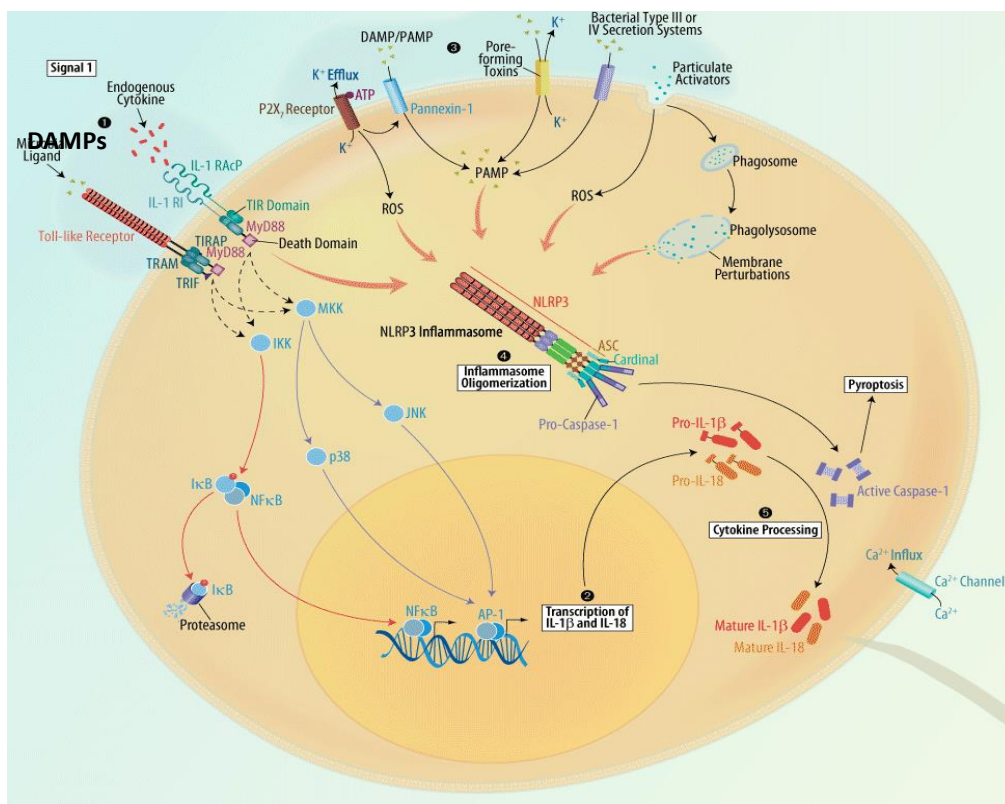


Figura 3. Cascata de ativação da via do NF- κ B por DAMPs (Figura adaptada de R&D Systems; Minneapolis, MN, USA).

Produtos naturais, extraídos de plantas, podem exercer efeito inibidor sobre processos inflamatórios, iniciados por ativação de NF- κ B. A

silimarina é um flavonóide, extrato obtido de frutos e sementes de *Silybum marianum*, família Asteraceae, uma das mais antigas e tradicionais ervas medicinais, utilizada por sua ação hepatoprotetora há mais de dois mil anos (Kren & Walterová, 2005) (Figura 4). O componente mais ativo e abundante da silimarina é a silibinina, que assim como a silimarina, apresenta importantes atividades de citoproteção, anti-inflamatórias, anti-fibróticas, anti-oxidantes e anti-carcinogênicas (Kren & Walterová, 2005; Agarwal et al., 2006; Deep & Agarwal, 2010; Esmail et al., 2017). Entre os mecanismos moleculares envolvidos nesses efeitos destaca-se a ação inibidora da silibinina sobre o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). De maneira geral, a silibinina parece interferir na cascata de transdução de sinais controlada pelo NF- κ B, suprimindo a fosforilação e degradação de I κ B, diminuindo assim, a translocação de NF- κ B para o núcleo. (Kren & Walterova, 2005; Comelli et al., 2007; Esmail et al., 2017; Matias et al., 2019).

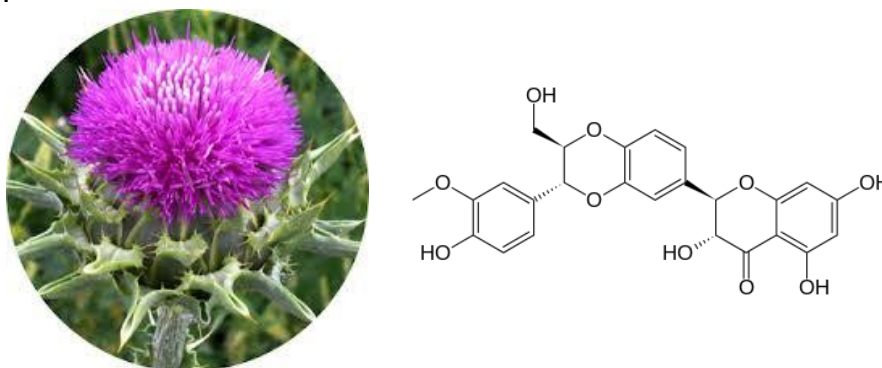


Figura 4. Imagem de *Silybum marianum* e estrutura química da silibinina. (Imagens de Bannwart et al., 2010b do Google em janeiro, 2020).

A silibinina tem sido empregada para tratamento de doenças humanas, devido sua toxicidade extremamente baixa, tornando o tratamento seguro e sem efeitos adversos (Hackett et al., 2013). Além disso, este flavonoide foi efetivo no tratamento de doenças hepáticas (Tamayo & Diamond, 2007) e como terapia adjuvante no câncer (Deep & Agarwal, 2007). Em trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório,

foi observado que a silibinina possui propriedades anti-oxidantes e anti-inflamatórias, demonstradas pela inibição dose-dependente sobre a liberação de H_2O_2 , da produção de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $TGF-\beta$ e de prostaglandina E2 (PGE2), por monócitos de sangue periférico obtidos de indivíduos saudáveis estimulados com LPS e tratados com 50 μM de silibinina (Bannwart et al., 2010a,b). Além disso, inibiu a ativação de NF- κB e a síntese das citocinas pro-inflamatórias $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$, produzidas por células mononucleares de sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (Giorgi et al., 2012; Cristofalo et al., 2013). O tratamento com silibinina em modelo experimental de PE, induzido em ratas pela inibição da enzima óxido nítrico sintase por Nw-nitro-L-arginine methyl ester, melhorou o desempenho reprodutivo das ratas, normalizou os níveis da pressão arterial e o número de plaquetas, diminuiu os níveis de proteinúria e das citocinas inflamatórias $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ e interferon-gama (IFN- γ) detectados no soro dos animais (Souza et al., 2012). Em trabalho recente demonstramos que o tratamento in vitro de monócitos de gestantes pré-eclâmpicas com silibinina modula a inflamação estéril estabelecida nessas células, diminuindo a ativação dos inflamasomas NLRP1 e NLRP3 e da via TLR4/NF- κB (Matias et al., 2019)

Considerando que a PE é caracterizada por resposta inflamatória exacerbada, envolvendo a polarização de monócitos para perfil inflamatório, pela expressão de receptores extracelulares de ativação e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, o emprego de moléculas moduladoras ou reguladoras de monócitos poderia contribuir para a melhor compreensão da imunidade inata e das vias de ativação dessas células envolvidas na fisiopatologia dessa síndrome da gestação.

Referências

- American College of Obstetricians and Gynecologists. Clinical Management Guidelines for Obstetrician–Gynecologists. Acog practice bulletin number 202. Gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2019; 133(1): e1-e25.
- Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res.* 2006; 26:4457-98.
- Aggarwal R, Jain AK, Mittal P, Kohli M, Jawanjal P, Rath G. Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. *J Clin Lab Anal.* 2019; 33:e22834..
- Akila P, Prashant V, Suma MN, Prashant SN, Chaitra TR. CD163 and its expanding functional repertoire. *Clin Chim Acta.* 2012; 413:669-74.
- Akinrinmade OA, Chetty S, Daramola AK, Islam M. CD64: An Attractive Immunotherapeutic Target for M1-type Macrophage Mediated Chronic Inflammatory Diseases. *Biomedicines.* 2017; 12: 1–18.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors, critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2:675-80.
- Al-ofi E, Coffelt SB, Anumba DO. Monocyte subpopulations from pre-eclamptic patients are abnormally skewed and exhibit exaggerated responses to Toll-like receptor ligands. *PLoS One.* 2012; 7:e42217.
- Bannwart CF, Nakaira-Takahagi E, Golim MA, Medeiros LTL, Romão M, Weel IC, et al. Downregulation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway by silibinin in human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Life Sciences* 2010a; 86:880-86.
- Bannwart CF, Peraçoli JC, Nakaira-Takahagi E, Peraçoli MT. Inhibitory effect of silibinin on tumour necrosis factor-alpha and hydrogen peroxide production by human monocytes. *Nat Prod Res.* 2010b; 24:1747-57.
- Barrera, D., Díaz, L., Noyola-Martínez, N. & Halhali, A. Vitamin D and Inflammatory Cytokines in Healthy and Preeclamptic Pregnancies. *Nutrients* 2015; 7:6465–90.
- Bernardi FC, Felisberto F, Vuolo F, et al. Oxidative damage, inflammation, and Tolllike receptor 4 pathway are increased in preeclamptic patients: a case-control study. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012:636419–29.

- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11:309-16.
- Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert 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; 6:137-43.
- Brien ME, Boufaied I, Soglio DD, Rey E, Leduc L, Girard S. Distinct inflammatory profile in preeclampsia and postpartum preeclampsia reveal unique mechanisms. *Biol Reprod.* 2019; 100:187-194
- Chen W, Qian L, Wu F, Li M, Wang H. Significance of Toll-like Receptor 4 Signaling in Peripheral Blood Monocytes of Pre-eclamptic Patients. *Hypertens Pregnancy.* 2015; 34:486-94.
- Comelli MC, Mengs U, Schneider C, Prosdocimi M. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. *Integr Cancer Ther.* 2007; 6:120-29.
- Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, Peraçoli MT. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res.* 2013; 47: 268-75.
- Deep G, Agarwal R. Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. *Integr Cancer Ther.* 2007; 6:130-45.
- Deep G, Agarwal R. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29:447-63.
- Echeverri N, Mockus I. Factor nuclear kB, signalossoma y su importancia em enfermedades inflamatorias y cancer. *Rev Fac Med* 2008; 56:133-46.
- Esmaeil N, Anaraki SB, Gharagozloo M, Moayedi B. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. *Int Immunopharmacol.* 2017; 50:194-201.
- Etzerodt A., Moestrup S. K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and Therapeutic aspects. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013; 18:2352–63.
- Faas MM, Spaans F, De Vos P. Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. *Front Immunol.* 2014; 5: 298.

- Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF- κ B pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol*. 2012; 95:67-72
- Goerdts 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; 67:222-6.
- Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010; 32:593-604.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:953-64.
- 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.
- Hackett ES, Twedt DC, Gustafson DL. Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. *J Vet Intern Med* 2013; 27:10-16.
- Hamilton S, Oomomian Y, Stephen G, Shynlova O, Tower CL, Garrod A, Lye SJ, Jones RL. Macrophages infiltrate the human and rat decidua during term and preterm labor: evidence that decidual inflammation precedes labor. *Biol Reprod*. 2012; 86:39.
- Harmon AC, Cornelius DC, Amaral LM, Faulkner JL, Cunningham MW Jr, Wallace K, LaMarca B. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 2016; 130:409-19.
- 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; 24:181-90.
- Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 2008; 51:970-5.
- Jena MK, Nayak N, Chen K, Nayak NR. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019; 67:295-309.
- Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P, Sooranna SR, Steer PJ. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction? *Br J*

- Obstet Gynaecol. 2002; 109:836-9.
- Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:138-44.
- Kharfi A, Giguère Y, Sapin V, Massé J, Dastugue B, Forest JC. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin Biochem*. 2003; 36:323-31
- Kikuchi-Taura A, Yura A, Tsuji S, Ohshima S, Kitatoube A, Shimizu T, Nii T, Katayama M, Teshigawara S, Yoshimura M, Kudo-Tanaka E, Harada Y, Matsushita M, Hashimoto J, Saeki Y. Monocyte CD64 expression as a novel biomarker for the disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2015; 24:1076-80.
- 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; 193:921-7.
- Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci*. 2008; 15:231-42.
- Kren V, Walterová D. Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2005; 149:29-41.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409:198-201.
- 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; 61:346-59.
- Lu Y, Wahl LM. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol* 2005; 175:5423-9.
- Luo Q, Xiao P, Li X, Deng Z, Qing C, Su R, Xu J, Guo Y, Huang Z, Li J. Overexpression of CD64 on CD14++CD16- and CD14++CD16+ monocytes of rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity. *Exp Ther Med*. 2018; 16:2703-11.
- Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol*. 2006; 118:268-75.

- Ma Y, Ye Y, Zhang J, Ruan CC, Gao PJ. Immune imbalance is associated with the development of preeclampsia. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98:e15080.
- Malyshev I, Malyshev Y. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: Intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage (switch) phenotype. *Biomed Res Inter* 2015; 2015:341308.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. Silymarin suppress TNF-induced activation of NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol* 1999; 163: 6800-9.
- 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; 25:677-86.
- Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33:1478-83.
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013; 229:176-85.
- Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med*. 2015; 212:435-45
- Martin AC, Brown MA. Could uric acid have a pathogenic role in pre-eclampsia? *Nat Rev Nephrol*. 2010; 6:744–748.
- Martin WJ, Shaw O, Liu X, Steiger S, Harper JL. Monosodium urate monohydrate crystal-recruited noninflammatory monocytes differentiate into M1-like proinflammatory macrophages in a peritoneal murine model of gout. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:1322-32.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008; 13: 453-61.
- Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, Araújo JP Jr, Peraçoli JC, de Oliveira L, Peraçoli MT. Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in pregnant women with preeclampsia. *PLoS One*. 2015; 10:e0129095.
- Matias ML, Gomes VJ, Romao-Veiga M, Ribeiro VR, Nunes PR, Romagnoli GG, Peraçoli JC, Peraçoli MTS. Silibinin Downregulates the NF- κ B Pathway and NLRP1/NLRP3 Inflammasomes in Monocytes from Pregnant Women with Preeclampsia. *Molecules*. 2019; 24. (8) pii: E1548.

- 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; 78:80-3.
- Medeiros LT, Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romão M, Weel IC, Golim MA, de Oliveira LG, Kurokawa CS, Medeiros Borges VT, Peraçoli MT. Monocytes from pregnant women with pre-eclampsia are polarized to a M1 phenotype. *Am J Reprod Immunol*. 2014; 72:5-13.
- Mol BW, Roberts CT, Thangaratnam S, Magee LA, Groot CG, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet* 2016; 387:999–1011.
- Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1221:80-7.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73:209-12.
- Mukhopadhyay D, Mukherjee S, Roy S, Dalton JE, Kundu S, Sarkar A, Das NK, Kaye PM, Chatterjee M. M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9:e0004145.
- Mulla MJ, Myrtolli K, Potter J, Boeras C, Kavathas PB, Sfakianaki AK, et al. Uric acid induces trophoblast IL-1 β production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 65:542-8.
- Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, Brien MÈ, Duval C, Chemtob S, Girard S. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction*. 2016; 152:R277-R292.
- Nonn O, Güttler J, Forstner D, Maninger S, Zadora J, Balogh A, Frolova A, Glasner A, Herse F, Gauster M. Placental CX3CL1 is Deregulated by Angiotensin II and Contributes to a Pro-Inflammatory Trophoblast-Monocyte Interaction. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(3). pii: E641.
- Nuner PR, Romão-Veiga M, Peraçoli JC, Araujo Costa RA, de Oliveira LG, Borges VTM, Peraçoli MT. Downregulation of CD163 in monocytes and its soluble form in the plasma is associated with a pro-inflammatory profile in pregnant women preeclampsia. *Immunol Res*. 2019; 67:194-201.
- Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 57:177-85.

- Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor- α production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 66:460-7.
- Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2013; 100:129-34.
- Pinheiro MB, Martins-Filho OA, Mota AP, Alpoim PN, Godoi LC, Silveira AC, Teixeira-Carvalho A, Gomes KB, Dusse LM. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine*. 2013; 62:165-73.
- 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; 142:481-9.
- Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013; 22:8-19.
- Raina K, Agarwal C, Agarwal R. Effect of silibinin in human colorectal cancer cells: targeting the activation of NF- κ B signaling. *Mol Carcinog*. 2013; 52:195-206.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 180:499-506.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta*. 2003; 24:S21-S27.
- Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005; 308:1592-4.
- Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998; 16:5-15.
- Romao-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Nunes PR, M Borges VT, Peraçoli JC, Peraçoli MTS. Induction of systemic inflammation by hyaluronan and hsp70 in women with pre-eclampsia. *Cytokine*. 2018; 105:23-31.
- Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed*

- Online. 2006; 13:680-6.
- 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.
- 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; 18:349-55.
- Sokolov DI, Ovchinnikova OM, Korenkov DA, Viknyanschuk AN, Benken KA, Onokhin KV, Selkov SA. Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes. *Transl Res*. 2016; 170:112-23.
- Souza CO, Peraçoli MT, Weel IC, Bannwart CF, Romão M, Nakaira-Takahagi E, Medeiros LT, Silva MG, Peraçoli JC. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of silibinin on experimental preeclampsia induced by L-NAME in rats. *Life Sci*. 2012; 91:159-65.
- Svensson-Arvelund J, Ernerudh J, Buse E, Cline JM, Haeger JD, Dixon D, et al. The placenta in toxicology. Part II: systemic and local immune adaptations in pregnancy. *Toxicol Pathol* (2014) 42(2):327–38
- Tamayo C, Diamond S. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.). *Integr Cancer Ther*. 2007; 6:146-157.
- Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. Phenotypic, Functional, and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015; 53:676-88.
- Thepen T, van Vuuren AJ, Kiekens RC, Damen CA, Vooijs WC, van De Winkel JG. Resolution of cutaneous inflammation after local elimination of macrophages. *Nat Biotechnol*. 2000; 18:48-51.
- Tian S, Zhang L, Tang J, Guo X, Dong K, Chen SY. HMGB1 exacerbates renal tubulointerstitial fibrosis through facilitating M1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015; 308:F69-75.
- Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the

- ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 2014; 4:97-104.
- van de Winkel JG, Capel PJ. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today.* 1993; 14:215-21.
- van Rijn BB, Franx A, Steegers EA, de Groot CJ, Bertina RM, Pasterkamp G, Voorbij HA, Bruinse HW, Roest M. Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS ONE.* 2008; 3:e1865.
- 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; 60:966-75.
- 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 (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:4560-5.
- Vishnyakova P, Elchaninov A, Fatkhudinov T, Sukhikh G. Role of the Monocyte-Macrophage System in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(15). pii: E3695.
- Weel IC, Baergen RN, Romão-Veiga M, Borges VT, Ribeiro VR, Witkin SS, Bannwart-Castro C, Peraçoli JC, De Oliveira L, Peraçoli MT. Association between Placental Lesions, Cytokines and Angiogenic Factors in Pregnant Women with Preeclampsia. *PLoS One.* 2016; 11:e0157584.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today.* 1993; 14:353-6.
- Wu ZM, Yang H, Li M, Yeh CC, Schatz F, Lockwood CJ, Di W, Huang SJ. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. *Placenta.* 2012; 33:188-94.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013; 496:445-55.
- 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: 615-9.

- Xiao J, Fu C, Zhang X, Zhu D, Chen W, Lu Y, Ye Z. Soluble monosodium urate, but not its crystal, induces toll like receptor 4-dependent immune activation in renal mesangial cells. *Mol Immunol*. 2015; 66:310-8.
- Yockey LJ, Iwasaki A. Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. *Immunity*. 2018; 49:397-412.
- Zhang YH, He M, Wang Y, Liao AH. Modulators of the Balance between M1 and M2 Macrophages during Pregnancy. *Front Immunol*. 2017; 8:120.
- Zuwala-Jagiello J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. *Acta Biochim Pol* 2006; 53:257-68.