



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



Envolvimento do inflamassoma na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

MARIANA ROMÃO VEIGA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Envolvimento do inflamassoma na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

MARIANA ROMÃO VEIGA

MARIA TEREZINHA SERRÃO PERAÇOLI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

**BOTUCATU – SP
2017**

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

Romao Veiga, Mariana.

Envolvimento do inflamassoma na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Mariana Romao Veiga. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Capes: 21104000

1. Citocinas. 2. Imunidade. 3. Células T - Receptores. 4. Pré-eclâmpsia. 5. Monócitos. 6. Resposta imune.

Palavras-chave: Citocinas; DAMPs; Monócitos; Pré-eclâmpsia; Subpopulações de células T.

Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP - Botucatu com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processos nº 2012/24697-8, 2013/00534-5.



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Que sempre me impulsiona em direção à minha vitória frente aos desafios da vida

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos”.

Antoine de Saint-Exupéry

Aos meus pais, José Carlos e Helena, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la e que, com muito amor e cuidado, me levaram a acreditar que tudo é possível!

Ao meu esposo, José Alberto (Beto), por todos esses anos de muito amor, amizade, apoio e felicidade.

Aos meus irmãos, Danilo e Gustavo, pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo, cuidando sempre dessa caçulinha.

Aos meus sobrinhos, Natália, Murilo, João Pedro e Felipe que alegam a minha vida todos os dias!

À minha Tia Maria, segunda mãe que esteve sempre presente e com muito carinho me apoiou nessa jornada.

Ao Sr. Veiga e D. Marisa, Tia Sílvia, Vó Flora, Luciana e Erick por me acolherem em sua família com tanto carinho. Obrigada por todo apoio!

À toda minha família, minha cunhada Renata, Vó Lourdes, Tia Lúcia, Tio Wilson, a todos tios, tias, primos e primas, obrigada por serem meu porto seguro, mais que qualquer outra coisa, por serem tudo o que acredito ser uma FAMÍLIA. Vocês são a minha vida!



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por todos os ensinamentos, sabedoria, compreensão e ajuda, por ser exemplo, profissional e principalmente pessoal. Meu muito obrigada pelo carinho, amizade e dedicação em todos esses anos de trabalho e convívio.

“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas e nos marcam para sempre.”

Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

Às meninas do LAB 3, Mariana, Vanessa e Priscila pela amizade, ajuda, ensinamentos, erros e risadas, obrigada por produzirem um ambiente de trabalho tão divertido e agradável.

Aos meus queridos amigos, Paola e Fernando, pelas horas de diversão, discussão, alegria e por permitirem que eu fizesse parte de suas vidas.

Aos amigos de longe, Pamella (Pam), Patrícia (Paty), Marcelo (Korone), Wilson (Fuzita), William, Camila (Cami), Ana Paula (Aninha), Leandro (Ledo), Sidarta e Amanda (Cacau), que apesar de longe, estão sempre perto, obrigada por todas as conversas!

Aos amigos, Célio, Alessandra, Cristiano, Fernanda (Felícia), Vitor, Rafael (Banana), Bruno, Adriana, Daniel (Lello), Juliana, Marcelo (Bolinha) e Jaqueline que tornaram meus dias muito mais felizes.

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

Ao prof. João Pessoa, prof. Ramon e Dra. Graziela, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por disponibilizarem seu laboratório e colaborarem com o andamento de meu trabalho.

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

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

Às gestantes que aceitaram participar desse trabalho, meu muito obrigada, sem vocês nada seria possível.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, por possibilitar a realização deste trabalho, e aos funcionários pela disposição e eficiência em todas as necessidades.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro para realização deste projeto Processos nº 2012/24697-8 e 2013/00534-5.

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

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Skłodowska Curie



SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
CAPÍTULO I.....	24
CAPÍTULO II.....	41
CAPÍTULO III.....	74
CONCLUSÕES.....	102
ANEXOS.....	104
ANEXO 1 – ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.....	105
ANEXO 2 – PARECER DO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA.....	144
ANEXO 3 – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	150
OUTRAS ATIVIDADES.....	153
1.1. HISTÓRICO ESCOLAR FINAL (ANEXO 01).....	154
1.2. ATA DE DEFESA (ANEXO 02).....	154
1.3. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS.....	154
1.4. PUBLICAÇÕES.....	154
1.5. ANAIS DE EVENTOS CIENTÍFICOS.....	155
1.6. PRÊMIOS.....	156
1.7. TREINAMENTO TÉCNICO.....	157
1.8. AVALIAÇÃO DE TRABALHOS.....	157



RESUMO

Introdução: A pré-eclampsia (PE) destaca-se como uma das principais causas de morbidade e mortalidade tanto materna como fetal, se caracteriza por ativação anormal do sistema imune inato e adaptativo. No plasma de gestantes portadoras de PE encontram-se níveis elevados de estruturas moleculares associadas ao estresse e morte celular, denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) como, proteína de choque térmico (Hsp70), HMGB1 (*high mobility group box 1*), Hialurona (HA) e Ácido Úrico, que parecem contribuir diretamente com a patogênese dessa doença. Essas DAMPs ligam-se a receptores presentes em células da imunidade inata, podendo ativar um complexo intracelular denominado inflamassoma, responsável pelo processamento e liberação de IL-1 β e IL-18. Essas citocinas são potentes mediadores inflamatórios e importantes na ativação da resposta imune adaptativa, auxiliando a ativação de células T em Th17 e Th1, respectivamente. Na PE, a ocorrência de resposta inflamatória sistêmica parece decorrer da deficiência no controle de células T efectoras por células T reguladoras (Treg). Portanto, o balanço entre células Treg e Th17 pode ser crítico para a tolerância ao feto e para a prevenção da doença.

Objetivos: O presente trabalho teve como objetivos: Avaliar o estado de ativação, endógena e induzida pelas DAMPs (urato monossódico (MSU), HA e Hsp70), em monócitos, pela identificação da presença do inflamassoma e associação com a produção de citocinas; Avaliar o envolvimento das subpopulações de células T (Th1, Th2, Treg e Th17) pela análise dos fatores de transcrição e pelo padrão de citocinas produzidas por essas células estimuladas com as DAMPs (MSU, HA e Hsp70).

Métodos e Resultados: Foram estudadas 20 gestantes portadoras de PE, 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres saudáveis não grávidas (MNG). O plasma foi separado e armazenado à -80°C para dosagem das DAMPs (ácido úrico, HA, HMGB1 e Hsp70). Monócitos de sangue periférico foram incubados na presença ou ausência das DAMPs (MSU, HA e Hsp70). O sobrenadante obtido após 18h de cultivo foi aspirado e empregado para dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-18 por ELISA. A presença de inflamassoma nessas células foi avaliada pela quantificação de RNAm de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , IL-18, TNF- α e HMGB1 por RT-qPCR após 4h de cultura. Os resultados mostraram concentração plasmática elevada de MSU, HA, Hsp70 e HMGB1 e expressão gênica endógena de

NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α e HMGB1 significativamente maior em gestantes com PE em comparação aos grupos GN e MNG. Em relação à produção endógena de citocinas, IL-1 β foi maior no grupo PE em relação aos grupos GN e MNG, enquanto IL-18 e TNF- α estão aumentadas apenas no grupo PE comparado ao grupo GN. O estímulo de monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas com MSU induziu aumento na expressão gênica de NLRP3, caspase-1 e TNF- α em relação à expressão endógena nesses grupos, enquanto esse efeito não foi observado em gestantes normotensas. Quando os monócitos foram estimulados com HA observou-se aumento da expressão de RNAm de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α e HMGB1, enquanto Hsp70 estimulou apenas a expressão de RNAm de TNF- α . A análise das citocinas por ELISA mostrou que monócitos de gestantes com PE produziram níveis endógenos e estimulados com MSU mais elevados de IL-1 β , IL-18 e TNF- α em comparação ao grupo GN. Todos os grupos apresentaram aumento de IL-1 β após estímulo com HA e aumento de IL-1 β e TNF- α quando estimulados com Hsp70. Para estudo das subpopulações de células T as células mononucleares do sangue periférico foram avaliadas pela expressão endógena dos fatores de transcrição para células T-bet (Th1), GATA3 (Th2), RORc (Th17) e Foxp3 (Treg) por citometria de fluxo. Essas células foram cultivadas na ausência ou presença das DAMPs e o sobrenadante foi empregado para determinação das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ e TNF- β), Th2 (IL-4), Treg (IL-10 e TGF- β 1) e Th17 (IL-17 e IL-22) por ELISA. Os resultados mostraram polarização para perfis inflamatórios Th1/Th17 e diminuição de perfis anti-inflamatórios Th2/Treg em gestantes portadoras de PE associados a níveis endógenos elevados das citocinas inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-17 e diminuídos de TGF- β e IL-10 quando comparadas com gestantes normotensas. O estímulo das células com MSU induziu aumento de IFN- γ , IL-22 em todos os grupos estudados, enquanto os estímulos com MSU e HA induziram aumento de IL-17 somente no grupo de normotensas. As DAMPs MSU e Hsp70 induziram aumento significativo da produção de TNF- α nos grupos de PE e MNG. Níveis elevados de TGF- β 1 foram produzidos por células de gestantes portadoras de PE estimuladas com MSU, HA e Hsp70, enquanto HA e Hsp70 induziram diminuição da produção dessa citocina em gestantes normotensas.

Conclusões: A maior expressão gênica endógena de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , HMGB1 e TNF- α em monócitos de gestantes pré-eclâmpticas

confirma o estado de ativação dessas células na PE. Assim como a ativação endógena para perfil Th1/Th17 e expressão elevada de citocinas inflamatórias em gestantes pré-eclâmpicas demonstra o desbalanço inflamatório presente nessas gestantes. As DAMPs foram capazes de estimular tanto a resposta imune inata como a adaptativa em gestantes pré-eclâmpicas sugerindo que essas alarminas desempenham papel na ativação do sistema imune e na liberação de citocinas inflamatórias participando na patogênese dessa importante síndrome da gestação.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia, citocinas, DAMPs, monócitos e subpopulações de células T.



ABSTRACT

Introduction: Preeclampsia (PE) stands out as one of the main causes of morbidity and mortality both maternal and fetal, characterized by abnormal activation of the innate and adaptive immune system. Plasma of pregnant women with PE shows high levels of molecular structures associated to stress and cell death, called damage associated molecular patterns (DAMPs) such as heat shock protein (Hsp70), HMGB1 (high mobility group box 1), Hyaluronan (HA) and Uric Acid, which seem to contribute directly to the pathogenesis of this disease. These DAMPs bind to receptors present in cells of innate immunity, and can activate an intracellular complex called inflammasomes, responsible for the processing and release of IL-1 β and IL-18. These cytokines are potent inflammatory mediators and important in the activation of the adaptive immune response, aiding the activation of T cells in Th17 and Th1, respectively. In PE, the occurrence of a systemic inflammatory response appears to be a consequence of deficiency in effector T cell control by regulatory T cells (Treg). Therefore, the balance between Treg and Th17 cells may be critical for fetus tolerance and disease prevention.

Objectives: This study aimed to: evaluate the activation state, endogenous and induced Damps (monosodium urate (MSU), HA and Hsp70) in monocytes, identifying the presence of inflammasomes and association with cytokine production; assess the involvement of T cell subpopulations (Th1, Th2, Treg and Th17) by the analysis of transcription factors and the pattern of cytokines produced by these cells stimulated with DAMPS (MSU HA and Hsp70).

Methods and Results: Twenty pregnant women with PE, 20 normotensive pregnant women (NT) and 20 healthy non-pregnant women (NP) were studied. Plasma was separated and stored at -80°C for determination of DAMPs (uric acid, HA, HMGB1 and Hsp70). Peripheral blood monocytes were incubated in the presence or absence of DAMPs (MSU, HA and Hsp70). The supernatant obtained after 18 h of culture was aspirated and used for determination of cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-18 by ELISA. The presence of inflammasomes in these cells was evaluated by quantification of mRNA of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , IL-18, TNF- α and HMGB1 by RT-qPCR after 4h of culture. The results showed high plasma concentration of MSU, HA, Hsp70 and HMGB1 and endogenous gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α and HMGB1 significantly higher in pregnant women with PE compared to NT and NP groups. In relation to the

endogenous production of cytokines, IL-1 β was higher in the PE group compared to the NT and NP groups, while IL-18 and TNF- α were increased only in the PE group compared to the NT group. Monocytes of pre-eclamptic and non-pregnant women stimulated with MSU induced an increase in the gene expression of NLRP3, caspase-1 and TNF- α regarding endogenous expression in these groups, however this effect was not observed in normotensive pregnant women. When monocytes were stimulated with HA, increased mRNA expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α and HMGB1 was observed, whereas Hsp70 stimulated TNF- α mRNA expression only. Cytokine analysis by ELISA showed that monocytes from pregnant women with PE produced higher levels endogenous and stimulated with MSU of IL-1 β , IL-18 and TNF- α compared to the NT group. All groups showed increase of IL-1 β after stimulation with HA and increase of IL-1 β and TNF- α when stimulated with Hsp70. For the study of T cell subpopulations, peripheral blood mononuclear cells were evaluated by endogenous expression of transcription factors T-bet (Th1), GATA3 (Th2), RORc (Th17) and Foxp3 (Treg) cells by flow cytometry. These cells were cultured in the absence or presence of DAMPs and the supernatant was used to determine cytokines Th1 (IFN- γ and TNF- β), Th2 (IL-4), Treg (IL-10 and TGF- β 1) and Th17 (IL-17 and IL-22) by ELISA. The results showed polarization for Th1/Th17 inflammatory profiles and decrease of Th2/Treg anti-inflammatory profiles in pregnant women with PE associated with elevated endogenous levels of the inflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-17 and decreased TGF- β And IL-10 when compared with normotensive pregnant women. Stimulation of the cells with MSU induced an increase of IFN- γ , IL-22 in all studied groups, whereas the stimuli with MSU and HA induced IL-17 increase only in the normotensive group. DAMPs MSU and Hsp70 induced a significant increase in TNF- α production in the PE and NP groups. Elevated levels of TGF- β 1 were produced by cells of pregnant women with PE stimulated with MSU, HA and Hsp70, whereas HA and Hsp70 induced decreased production of this cytokine in normotensive pregnant women.

Conclusions: The higher endogenous gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , HMGB1 and TNF- α in monocytes of pre-eclamptic women confirms the activation state of these cells in PE. As well as the endogenous activation of Th1/Th17 profile and high expression of inflammatory cytokines in pregnant women with PE demonstrates the inflammatory imbalance present in these pregnant women.

DAMPs were able to stimulate both the innate and adaptive immune response in preeclamptic women suggesting that these alarmins play a role in the activation of the immune system and in the release of inflammatory cytokines participating in the pathogenesis of this important gestational syndrome.

Keywords: Pre-eclampsia, cytokines, DAMPs, monocytes and T-cell subsets.



INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia é uma síndrome específica da gestação humana, que, entre outras manifestações, apresenta desvio da resposta imune para perfil inflamatório intenso, apresentando ativação endógena de células da imunidade inata e adaptativa. Grande parte das gestantes que desenvolvem essa síndrome, não apresentam sinais clínicos de infecção, portanto, acreditamos que a inflamação estéril participa na indução e manutenção dessa inflamação exacerbada presente nessas gestantes.

Essa inflamação estéril pode ser desencadeada pela presença de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que se encontram aumentados no plasma dessas gestantes, contribuindo tanto para a inflamação placentária local como para a inflamação sistêmica e a disfunção endotelial.

Nesse contexto de inflamação estéril é interessante conhecer a capacidade dessas DAMPs em ativar a resposta inflamatória em gestantes portadoras PE, tanto na imunidade inata, como na imunidade adaptativa.

O presente trabalho foi então formulado e discutido em três capítulos com formato de artigos.

Capítulo 1 – artigo científico publicado

Endogenous and Uric Acid-Induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia. PLoS One. 2015; 10(6):e0129095. doi: 10.1371/journal.pone.0129095.

Capítulo 2 – artigo submetido para publicação

DAMPs induzem inflamação em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

Capítulo 3 – manuscrito em preparação

DAMPs induzem polarização da imunidade adaptativa para perfil inflamatório em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia



OBJETIVOS

O presente estudo avaliou, em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia:

- a) A ativação dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3, tanto endógeno como estimulados por urato monossódico em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e sua associação com produção de citocinas inflamatórias.
- b) O estado de ativação, endógena e induzida pelas DAMPs (Hsp70 e hialurona), em monócitos de gestantes com PE pela identificação da presença dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e associação com a produção de IL-1 β , TNF- α e IL-18 nessas células.
- c) O envolvimento das subpopulações de células T (Th1, Th2, Treg e Th17) na fisiopatologia da PE, analisando os fatores de transcrição e perfil de citocinas, estimuladas ou não com as DAMPs (Hsp70, hialurona e urato monossódico), produzidos por essas subpopulações celulares.



RESULTADOS E DISCUSSÃO



CAPÍTULO I

RESEARCH ARTICLE

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

Mariana Leticia Matias¹, Mariana Romão², Ingrid Cristina Weel², Vanessa Rocha Ribeiro², Priscila Rezek Nunes², Vera Therezinha Borges¹, João Pessoa Araújo, Jr², José Carlos Peraçoli¹, Leandro de Oliveira¹, Maria Terezinha Peraçoli^{2*}

1 Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil, **2** Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

* tperaçoli@uol.com.br



OPEN ACCESS

Citation: Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, et al. (2015) Endogenous and Uric Acid-Induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia. PLoS ONE 10(6): e0129095. doi:10.1371/journal.pone.0129095

Received: February 2, 2015

Accepted: May 5, 2015

Published: June 8, 2015

Copyright: © 2015 Matias et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

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

Introduction

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

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

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

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

Uric acid (monosodium urate-MSU) crystals may activate an intracellular complex called inflammasome, a multi-protein structure which is important for processing and release of IL-1 β and IL-18 [21, 22]. Inflammasome formation depends on receptors known as pattern recognition receptors (PRRs) expressed by cells of the innate immune system, such as monocytes, macrophages and dendritic cells [23, 24]. Among the various PRRs, nod-like intracellular receptors with a pyrin domain (NLRP), are responsible for inflammasome formation in response to pathogens known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) contributing to the host defense against infections [25] or also bind endogenous products of host cells, named danger-associated molecular patterns (DAMPs) [23, 26, 27]. Three NLR proteins have been identified to form inflammasome: NLRP1, NLRP3 and NLRC4 [22]. The NLRP3 inflammasome is the most studied inflammasome, and capable of sensing a wide variety of alarm signals [28]. In addition, some evidence indicates that NLRP3 plays an important role in inflammatory

diseases such as atherosclerosis, gout, type 1 and type 2 diabetes [22,29,30]. After interaction with the ligand, several NLRP3 identical proteins form an oligomer and each NLRP3 of the oligomer binds to an adapter protein called ASC (apoptosis-associated speck-like protein). This binds to the inactive precursor form of caspase-1 enzyme, which becomes active and cleaves pro-IL-1 β , resulting in biologically active IL-1 β generation which subsequently is secreted into the extracellular medium [31,32].

Several endogenous molecules, considered "danger signals" such as MSU crystals, ATP, β -amyloid or hyaluronan) when in high concentrations, induce NLRP3 inflammasome activation, playing an important role in inflammatory diseases [27]. Conforti-Andreoni and collaborators [33] reported the importance of uric acid, together with the signaling pathway of the nuclear transcription factor-kB (NF-kB), in the inflammasome activation of dendritic cells as well as IL-1 β and IL-18 production. According to Rock and collaborators [34], uric acid plays a pathophysiological role as a local alarm signal that alerts the immune system against cellular injury and aids in the development of innate and adaptive immune responses.

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

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

Material and Methods

Study population

This study consisted of 46 pregnant women without previous history of hypertension or obstetric and medical complications, admitted to the Obstetric Unit of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil between March 2013 and October 2014. Twenty three women were diagnosed with preeclampsia (PE), defined as a persistent elevated blood pressure value of 140x90 mmHg and proteinuria ($\geq$ 300 mg in urine collected during 24 hours) after the 20th weeks of gestation [2], and 23 pregnant women with an uncomplicated pregnancy that remained normotensive (NT) and nonproteinuric throughout pregnancy were recruited as controls and matched for gestational age with the preeclamptic group. A group of 23 non-pregnant women (NP) was added to establish the comparison of immunological parameters between groups. Gestational age was calculated from the last menstrual period and confirmed by ultrasound dating. Non-pregnant women were voluntary donors of the Blood Bank of the Hemocenter of the Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil. Proteinuria in 24-hour urine was measured by a colorimetric method, the Technicon RAXT automation system, and uric acid was assessed by uric acid enzymaticTrinder (Biotrol Diagnostic) in the Clinical Laboratory, Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil. Exclusion criteria for the three groups included chronic hypertension, multiple gestation, prior preeclampsia, illicit drug use, and preexisting medical conditions such as diabetes, cancer, acute infectious disease, cardiovascular, autoimmune, renal and hepatic diseases. All of the patients and controls agreed to

participate in the study after due clarification and signing of a written informed consent form. This study was approved by Botucatu Medical School–UNESP Research Ethics Committee.

Blood sampling

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

Isolation and culture of monocytes

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque Premium [density (d) = 1.077] (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) according to the method described by Boyum [37]. Briefly, 10 mL of blood was mixed with an equal volume of RPMI 1640 tissue culture medium (Sigma-Aldrich, Chemical Co., St Louis, Missouri, USA) containing 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 20 mM HEPES, and 40 μ g/mL gentamicin (complete medium). Samples were layered over 5 mL Ficoll-Paque Premium in a 15 mL conical plastic centrifuge tube. After centrifuging at 400 g for 30 minutes at room temperature, the interface layer of PBMC was carefully aspirated and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (PBS-EDTA) and once with complete medium, with centrifugation in between washes at 300 g for 10 minutes. Cell viability, as determined by 0.2% Trypan Blue dye exclusion, was >95% in all experiments. Monocytes were counted using neutral red (0.02%) in PBMC suspension and a suspension of 5×10^5 monocytes/mL in complete medium was employed for gene expression and cytokines determination.

Monocyte culture supernatants

Monocyte suspensions (5×10^5 cells/mL) were distributed (1 mL/well) in 24-well flat-bottomed plates (Greiner Bio-One, Germany). After incubation for 2 h at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, non-adherent cells were removed by aspiration and each well rinsed twice with complete medium. Monocyte preparations routinely contained >90% monocytes as determined by morphologic examination and staining for nonspecific esterase [38]. Monocytes were incubated with complete medium in the presence or absence of 50 μ g/mL of monosodium urate (MSU) (Invivogen, San Diego, CA, USA) for 18 h at 37°C in 5% CO₂. The MSU concentration used as stimulus in monocyte cultures was previously standardized employing monocytes from five healthy non-pregnant women. This concentration of MSU (50 μ g/mL) was chosen to simulate the levels of uric acid in preeclamptic women plasma, ranging from 45 to 100 μ g/mL. Culture supernatants were harvested and stored at -80°C for cytokine determination.

Cytokine determination

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

Evaluation of the expression of transcripts related to inflammation

Monocytes from normotensive, preeclamptic and non-pregnant women were incubated with complete medium in the presence or absence of 50 µg/mL of monosodium urate (MSU) (InvivoGen, San Diego, CA, USA) for 4 h at 37°C in 5% CO₂, and were subjected to analysis of the expression, on the transcriptional level, of the gene encoding the proteins NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β, IL-18 and TNF-α. Glybenclamide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at concentration of 50 and 200 µM was added to cultures of monocytes from non-pregnant women for 30 min, and then MSU (50 and 100 µg/mL) was added to the culture for another 4h in order to evaluate its inhibitory effect on NLRP3 inflammasome activation by MSU. Total RNA was extracted from monocytes through the system Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, Canada) according to manufacturer's protocol. After extraction, to ensure complete removal of genomic DNA, 1 µg of total RNA was incubated with DNase I Amp Grade (Invitrogen). The purity and relative quality of all samples of total RNA obtained were determined by fluorometry using the equipment Qubit Fluorometric Quantitation (Life Technologies). Subsequently, the synthesis of complementary DNA (cDNA) for performing the polymerase chain reaction coupled reverse transcription (Reverse Transcription-coupled polymerase chain reaction—RT-PCR) was conducted with 450ng of total RNA in 60µL reaction using ImProm- II™ Reverse Transcription System, according to manufacturer's protocol.

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

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

Each reaction was set in duplicate in a total of 20µL each, which contains 0.3 µM of each primer (forward and reverse), 2 µL of cDNA, 10 µL of master mix and 6 µL of nuclease-free water. Additionally, was inserted a control, also in duplicate, which was included in each reaction in order to prove that there is no contamination. The conditions for the RT-qPCR reactions were: initial denaturation at 96°C—2 min and then 40 cycles at 95°C- 15s and 60°C -60s, followed by a melting curve. The amplification of each particular transcript was confirmed by melting curve generated profile of the end of each reaction.

Expression values of the analyzed transcripts were normalized based on the concurrent analysis of the expression of the enzyme encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH). The calculation of the differential expression of selected genes was carried out by the data processing method compared to a standard curve [39]. All conditions, including

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

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

doi:10.1371/journal.pone.0129095.t001

GAPDH for each sample and the negative control reaction (No Template Control—NTC, absence of RNA) were analyzed in duplicates. To analyze the relative expression, after the analysis of gene expression, we chose an RNA sample obtained from each group, which received the relative value of 100. All other samples received values for that sample.

Statistical analysis

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

Results

Demographic and clinical characteristics

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

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

Fig 1A, 1B and 1C show, respectively, higher gene expression of NLRP1, NLRP3 receptors and caspase-1 in monocytes from pregnant women with PE, stimulated or not with MSU, when compared to NT and NP groups. Lower expression of these genes was detected in monocytes from normotensive pregnant women both stimulated or not with MSU, compared to NP group. In preeclamptic pregnant and NP groups, MSU induced higher expression of NLRP3

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

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

Data are presented as median, with the minimum and maximum values in parentheses, or as percentage. N/A = not applicable.

* ($p < 0.05$) vs normotensive pregnant women (Mann-Whitney *U* test)

($p < 0.05$) vs normotensive pregnant women and non-pregnant women (Kruskal-Wallis test).

doi:10.1371/journal.pone.0129095.t002

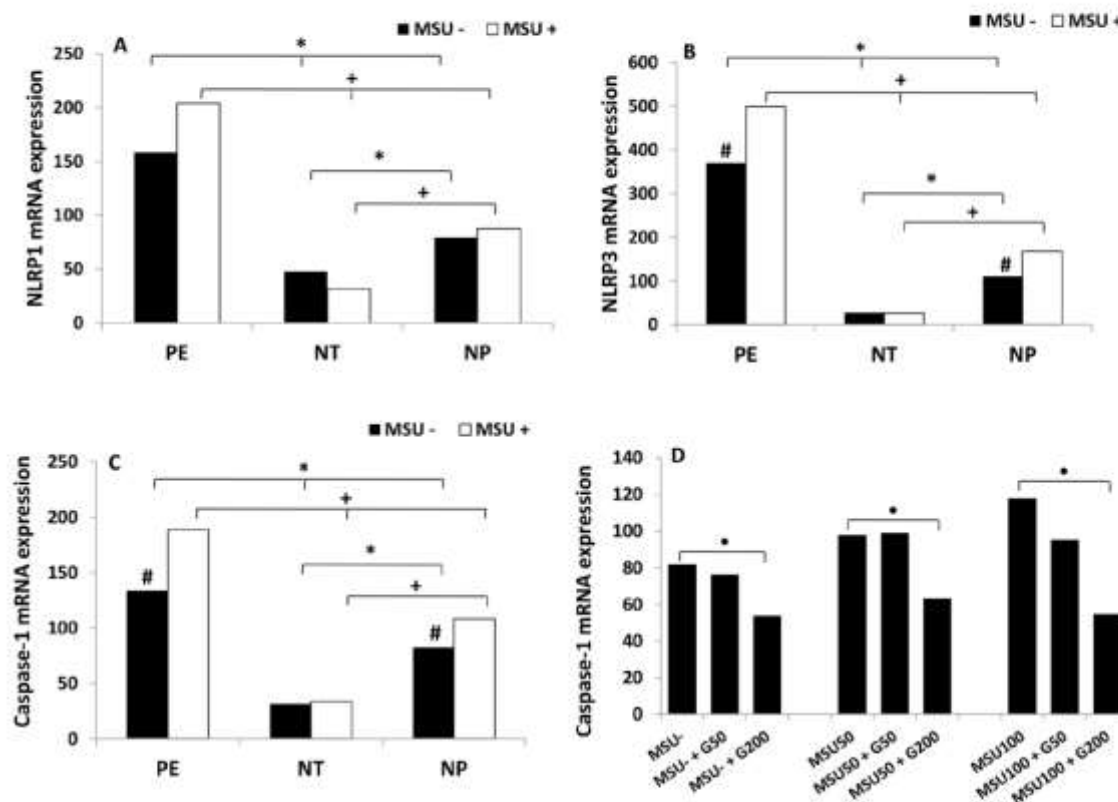


Fig 1. Gene expression of NLRP1 (A), NLRP3 (B) and caspase-1 (C) by monocytes. Monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), were cultured in the presence (MSU⁺) or absence (MSU⁻) of monosodium urate. Expression of caspase-1 (D) by monocytes from non-pregnant women treated with 50 μ M or 200 μ M of Glybenclamide and cultured in the presence (MSU⁺) or absence (MSU⁻) of monosodium urate. Results are shown as median. * $P < 0.05$ shows significant difference between MSU⁺ groups; # $P < 0.05$ vs MSU⁻; * $P < 0.05$ (MSU⁻ vs MSU⁺ + G200), (MSU50 vs MSU50 + G200), (MSU100 vs MSU100 + G200).

doi:10.1371/journal.pone.0129095.g001

receptor and caspase-1 compared to endogenous levels of this mRNA in monocytes from these groups. There was a tendency to an increase in NLRP1 mRNA expression in cells of pregnant women with PE stimulated with MSU compared with non-stimulated cells, but this difference was not significant.

The results also showed that the transcriptional profile of NLRP3 receptor was more elevated than the NLRP1 one, in monocyte from pregnant women with PE and in non-pregnant women. Fig 1D shows that Glybenclamide at 200 μ M significantly inhibited caspase-1 mRNA expression by monocytes from non-pregnant women in a dose-dependent manner.

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

groups. Glybenclamide added to monocyte cultures from non-pregnant women, in the presence or absence of MSU significantly inhibited IL-1 β mRNA expression in a dose-dependent fashion (Fig 2C). Inhibitory effect was achieved with the concentration of (200 μ M).

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

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

Cytokine production by monocytes from pregnant and non-pregnant women

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

There is an increase in the endogenous concentration of IL-1 β produced by monocytes from pregnant women with PE compared to NT and NP groups. The MSU stimulation induced higher production of IL-1 β by cells from preeclamptic pregnant women compared to NT group. It is also possible to notice a decrease in cytokine expression in monocytes from normotensive pregnant women stimulated with MSU compared to the NP group (Fig 4A). However, there is significant difference between the production of IL-1 β by monocytes from NT groups and NP that were stimulated with MSU (MSU+) and the basal production of these cells. There was a tendency to increase levels of IL-1 β produced by monocytes from the preeclamptic group, when the cells were stimulated with MSU compared to unstimulated cells, but this difference did not reach statistical significance.

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

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

Discussion

In pregnant women with PE elevated serum levels of uric acid associated with increased production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α by mononuclear cells from

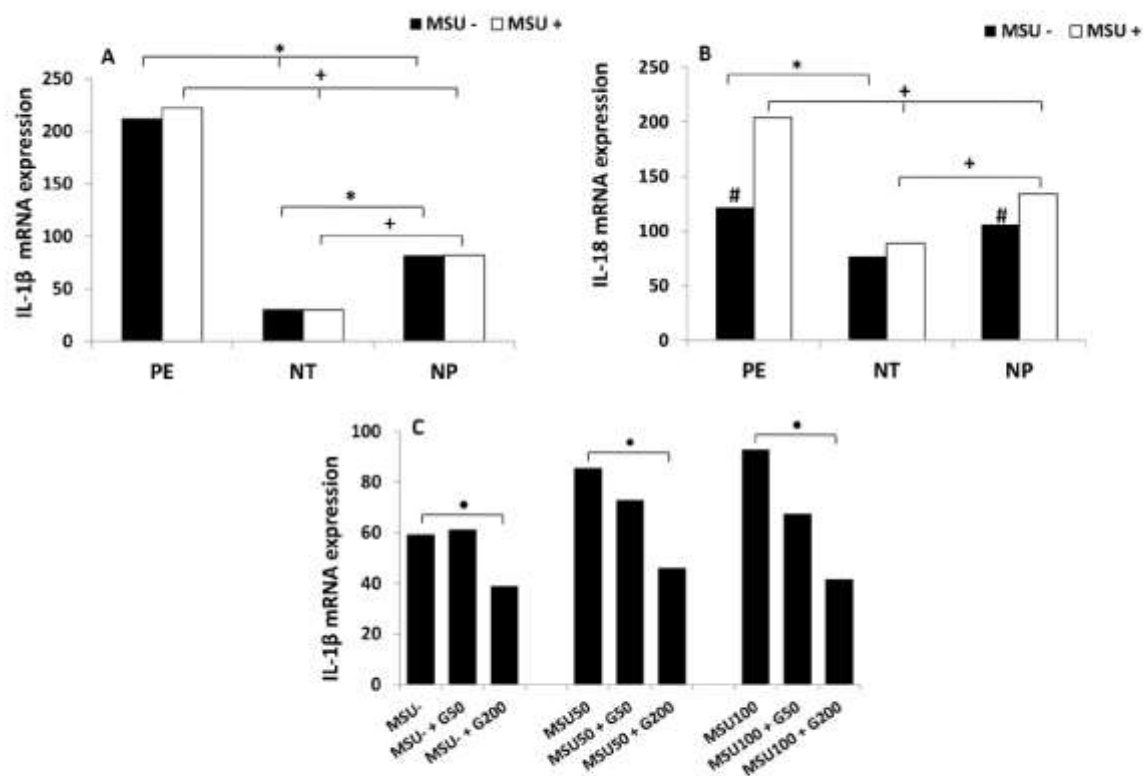


Fig 2. Gene expression of IL-1 β (A) and IL-18 (B) by monocytes. Monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), were cultured in the presence (MSU⁺) or absence (MSU⁻) of monosodium urate. Expression of IL-1 β (C) by monocytes from non-pregnant women treated with 50 μ M and 200 μ M of Glybenclamide, in the presence (MSU⁺) or absence (MSU⁻) of monosodium urate. Results are shown as median. * $P < 0.05$ shows significant difference between MSU⁺ groups; # $P < 0.05$ vs MSU⁻; + $P < 0.05$ (MSU⁻ vs MSU⁺ + G200), (MSU50 vs MSU50 + G200), (MSU100 vs MSU100 + G200).

doi:10.1371/journal.pone.0129095.g002

peripheral blood [16], suggest participation of hyperuricemia in the pathogenesis of PE. It is known that uric acid crystals (MSU) act as DAMPs activating the complex NLRP3 inflammasome [40]. The results of the present study show higher gene expression of NLRP1 and NLRP3 receptors, caspase-1 as well as IL-1 β , IL-18 and TNF- α in peripheral blood monocytes of pregnant women with PE. These results suggest the endogenous activation of these cells, associated with increased production of inflammatory cytokines compared with monocytes from normotensive pregnant women.

It was observed that the gene expression of NLRP1, NLRP3 and caspase-1 have similar profiles to each other and higher expression in monocytes from pre-eclamptic women compared with normotensive pregnant women and non-pregnant women groups. A recent study [35], showed that uric acid activates the inflammasome in trophoblast cells, leading to IL-1 β secretion and, suggesting that it is a novel mechanism for induction of inflammation in the maternal-fetal interface and causing adverse pregnancy outcomes, including preeclampsia. Caspases are important cysteinyl aspartate proteases in apoptosis and inflammation mechanisms [41]. Caspase-1 is an important inflammatory protein synthesized as pro-caspase-1, and becomes biologically activated when inflammasome starts its generation process [42,43]. It is recognized

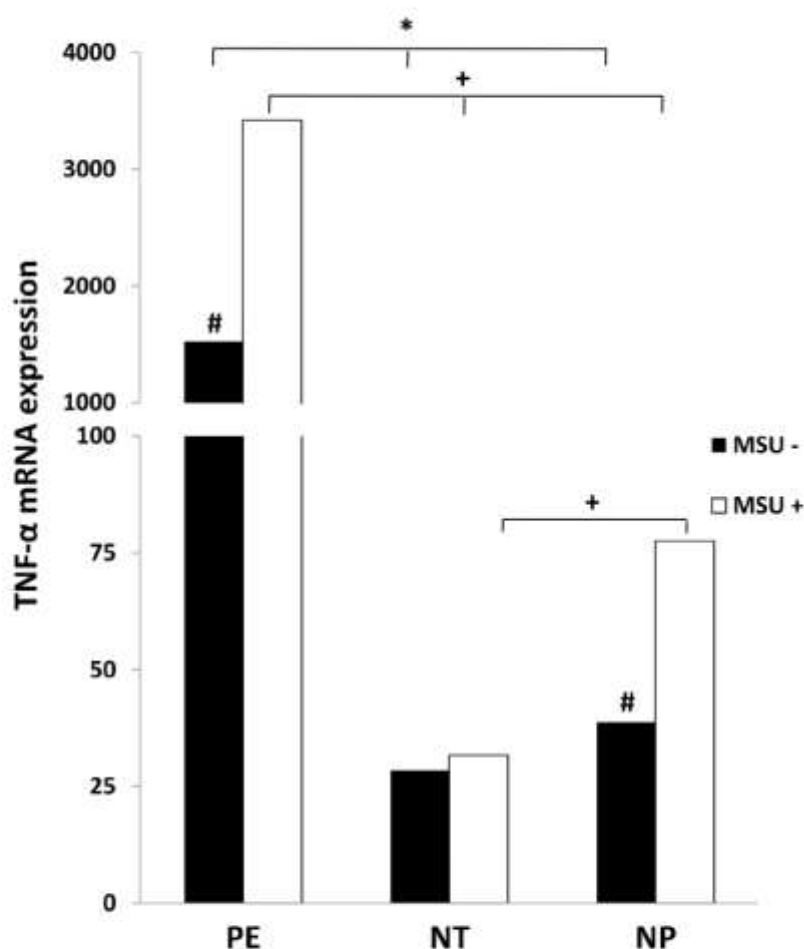


Fig 3. Gene expression of TNF- α by monocytes. Monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), were cultured in the presence (MSU+) or absence (MSU-) of monosodium urate. Results are shown as median. * $P < 0.05$ shows significant difference between MSU groups; # $P < 0.05$ vs MSU-.

doi:10.1371/journal.pone.0129095.g003

in the literature that NLRP1, NLRP3, AIM2 and IPAF inflammasomes are responsible for caspase-1 activation process, leading to the processing and release of IL-1 β and IL-18 [44].

According to Martinon et al. [21], monosodium urate triggers the increase in gene expression of NLRP3 and caspase-1 in lineage of THP1 monocytes. Our results corroborate with these authors, showing that the stimulus with MSU induces increased NLRP3 and caspase-1 expression in monocytes from women with PE and from non-pregnant women, while the NLRP1 gene showed only a tendency to increased expression by monocytes of pregnant women with PE without statistical significance. Our results about reduction of gene expression of caspase-1 and IL-1 β by monocytes stimulated with MSU in the presence of Glybenclamide,

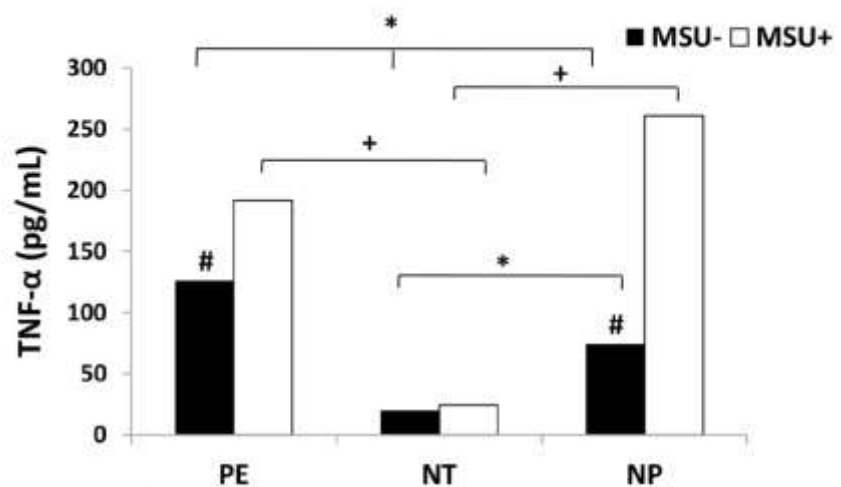


Fig 4. IL-1 β (A) and IL-18 (B) production by monocytes. Monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), were cultured in the presence (MSU+) or absence (MSU-) of monosodium urate. Results are shown as median. * $P < 0.05$ shows significant difference between MSU+ groups; # $P < 0.05$ vs MSU-.

doi:10.1371/journal.pone.0129095.g004

an inflammasome inhibitor [45] suggests that caspase-1 and IL-1 β expression are dependent on NLRP3 activation by MSU. However, the precise molecular details of NLRP3 inflammasome in response to uric acid in preeclampsia remain to be elucidated. In the present study, the demonstrated capacity of NLRP3 inflammasome in inducing IL-1 β production suggests a role for this mechanism in the systemic inflammatory response observed in preeclampsia.

The gene expression of NLRP1 and NLRP3 receptors, caspase-1, IL-1 β , IL-18 and TNF- α , as well as the production of these cytokines was higher in monocytes from pregnant women with PE stimulated with MSU compared with normotensive pregnant women.

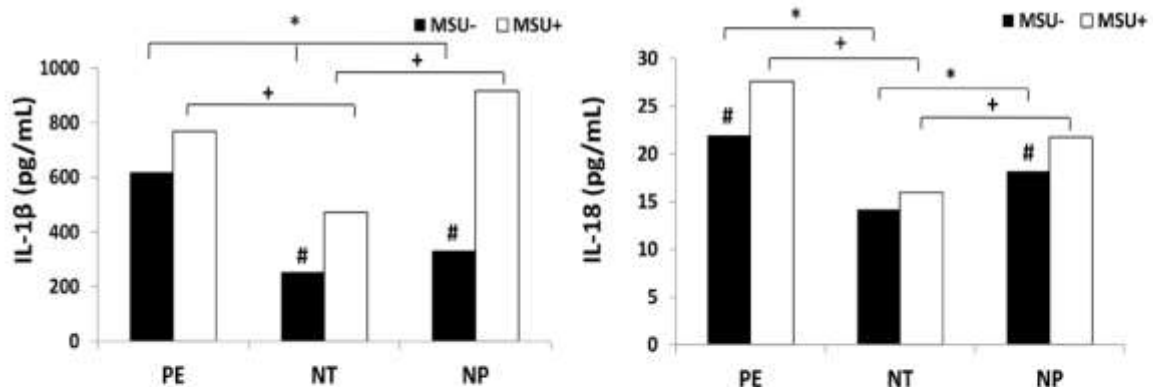


Fig 5. TNF- α production by monocytes. Monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), were cultured in the presence (MSU+) or absence (MSU-) of monosodium urate. Results are shown as median. * $P < 0.05$ shows significant difference between MSU+ groups; # $P < 0.05$ vs MSU-.

doi:10.1371/journal.pone.0129095.g005

However, when compared to monocytes from healthy women, this increase is significant only in transcriptional, but not in protein level. This difference between gene expression and production of cytokines could be related to the fact that multiple ribosomes can translate a single mRNA molecule at the same time. Ribosomes groups called polysome, allow the simultaneous production of multiple strings of amino acids (polypeptides). These polypeptides may be complete or require further processing to become mature and to acquire a three-dimensional conformation [46].

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

In preeclamptic women there was no significant increase in gene expression and production of IL-1 β after monocyte stimulation with MSU as showed in Fig 2. This phenomenon may be occurred probably because the cells were already significantly activated in PE, and producing higher endogenous levels of this cytokine. Siljee et al. [47] suggest that increased serum levels of IL-1 β during the first trimester of pregnancy, in the absence of other inflammatory proteins, can be considered an early biomarker of PE onset, and an important pathogenic factor for the development of this disease.

Monocytes from normotensive pregnant women stimulated with MSU, in turn, have lower gene and protein expression of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-18 and TNF- α in relation to PE and NP groups. The lowest gene expression of these cytokines by monocytes from NT group could be due to the regulatory activity of IL-10 on these cells. The predominance of higher levels of this anti-inflammatory cytokine predominance in normal pregnancy acts to minimize the deleterious effects of excessive inflammatory response, being able to regulate the inflammatory response that occurs during pregnancy by controlling the IL-1 β and TNF- α gene expression [48]. It is known that IL-10 exerts a potent inhibitory effect on the production of inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α by activated monocytes [49]. However, in PE, this regulation does not occur adequately, and the balance is altered, with decreased IL-10 and increased TNF- α [50]. In previous work, it was shown that monocytes from preeclamptic pregnant women produce endogenous IL-10 significantly lower than in normotensive pregnant women, while TNF- α values are high [13], confirming the findings in the literature [12,51].

In the present study no significant differences were detected between preeclamptic and NP groups in relation to endogenous IL-18 gene expression and cytokine production. However, monocytes from these both groups produced higher levels of IL-18 after MSU stimulation (Figs 2B and 4B). Pro-IL-18 is constitutively present in healthy people monocytes [52]. Then, it was expected that the increase in gene and protein expression was not as obvious as that of other inflammatory cytokines. IL-18 is also secreted by inflammasome activation [53,54]. We also observed that there was more intense production of IL-1 β than IL-18, demonstrated by high levels of IL-1 β secreted by monocytes from the three groups. It is believed that this may be occurred because IL-18 also stimulates the secretion of Th2 cytokines with anti-inflammatory activity [55]. Thus, IL-18 induces Th1 and Th2 responses, acting as a cytokine with both inflammatory and anti-inflammatory profiles.

The production of proinflammatory cytokines is a critical step for an effective innate immune response and is also a mechanism by which this response influences the subsequent development of adaptive immune response [56]. IL-1 β and IL-18 are examples of key cytokines which not only activates monocytes, macrophages and neutrophils but also specifically direct

the development of the adaptive immune response of CD4+ T cells in humans and mice. The differentiation of CD4+ T cells in the presence of IL-1 β and IL-18 results in Th17 and Th1 effector cells, respectively [57,58]. The predominant profile of Th17 cells on regulatory T cells in pregnant women with PE could act by modulating the Th1/Th2 balance [59], suggesting that both innate and adaptive immunity are involved in the excessive inflammatory response that occurs in this obstetric pathology [60].

The endogenous and MSU-induced gene expression of TNF- α , was higher in monocytes from pregnant women with PE compared to NT and NP groups, while the cytokine production was significantly higher in PE group than in the NT group. This increased TNF- α production by monocytes from pre-eclamptic pregnant women confirms previous results from the literature [11,13,61], demonstrating that elevated serum uric acid levels correlate with increased production of TNF- α and free radicals released by monocytes from pregnant women with PE compared to normotensive pregnant women [14]. These elevated levels of TNF- α in peripheral blood of pre-eclamptic pregnant woman might activate NLRP1 and NLRP3 inflammasomes in monocytes by its stimulatory effect on the nuclear factor- κ B transcription. The synthesis of TNF- α and IL-1 β is controlled, in part, by NF- κ B, which is more active in pregnant women with PE cells [16]. NF- κ B regulates the transcription of genes related to inflammation [62,63] and TNF- α , in turn, acts stimulating NF- κ B activation, and maintaining a cell cycle activation [64]. Thus, although not directly related to the inflammasome, TNF- α is an important inflammatory cytokine produced in the first activation signal of this multiprotein complex.

Activation of inflammasomes by MSU requires two signals. The first is the recognition of MSU by the extracellular toll-like (TLR) receptor, leading to the nuclear transcription factor (NF- κ B) activation, and causing production of pro-IL-1 β by monocytes, as previously described in gout [22]. The second signal depends on phagocytosis of MSU crystals and their recognition by NLRP3 inflammasome in monocytes, resulting in activation of caspase-1 and subsequent cleavage of pro-IL-1 β to produce active IL-1 β . According to Bauernfeind et al. [65], the need for this double stimulation to activate the inflammasome might be important for preventing uncontrolled activation of NLRP3, a responsible that could lead to devastating consequences in the host, as seen in autoinflammatory diseases.

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

Acknowledgments

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

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MTP JCP MR MLM. Performed the experiments: MLM MR ICW VRR PRN JPAJr. Analyzed the data: MLM MR JPAJr MTP. Contributed reagents/materials/analysis tools: MLM MR MTP VRR PRN JPAJr. Wrote the paper: MLM MR MTP JCP. Selected pregnant women: JCP VTB LdO.

References

1. Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction*. 2010; 140:803–313. doi: [10.1530/REP-10-0294](#) PMID: [20837731](#)
2. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183:S1–S22. PMID: [10944363](#)
3. De Oliveira LG, Karumanchi A, Sass N. Preeclampsia: oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction. *Ver Bras Ginecol Obst*. 2010; 32:609–616.
4. Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998; 16:5–15. PMID: [9654603](#)
5. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11:309–316. PMID: [16828580](#)
6. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005; 308:1592–1594. PMID: [15947178](#)
7. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 180:499–506. PMID: [9988828](#)
8. Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P, Sooranna SR, Steer PJ. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction? *Br J Obstet Gynaecol*. 2002; 109:836–839.
9. Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—a review. *Placenta*. 2003; 24:S21–S27. PMID: [12842410](#)
10. Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol*. 2006; 118:268–275. PMID: [16337193](#)
11. Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor- α in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 57:177–185. PMID: [17295896](#)
12. Orange S, Horvath J, Hennessy A. Preeclampsia is associated with a reduced interleukin-10 production from peripheral blood mononuclear cells. *Hypertens Pregnancy*. 2003; 22:1–8. PMID: [12648438](#)
13. Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, et al. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res*. 2013; 47:268–275. doi: [10.3109/10715762.2013.765951](#) PMID: [23316804](#)
14. Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, et al. 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; 66:460–467. doi: [10.1111/j.1600-0897.2011.01016.x](#) PMID: [21623992](#)
15. Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A, et al. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2009; 61:346–359. doi: [10.1111/j.1600-0897.2009.00701.x](#) PMID: [19341385](#)
16. Giorgi VS, Peraçoli MT, Peraçoli 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. doi: [10.1016/j.jri.2012.06.004](#) PMID: [22871551](#)
17. Medeiros LT, Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romão M, Weel IC, Golim MA, et al. Monocytes from pregnant women with pre-eclampsia are polarized to a M1 phenotype. *Am J Reprod Immunol*. 2014; 72:5–13. doi: [10.1111/aji.12222](#) PMID: [24689463](#)
18. Martin AC, Brown MA. Could uric acid have a pathogenic role in pre-eclampsia? *Nat Rev Nephrol*. 2010; 6:744–748. doi: [10.1038/nrneph.2010.125](#) PMID: [20956991](#)
19. Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, et al. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2013; 100:129–134. doi: [10.1016/j.jri.2013.08.003](#) PMID: [24051131](#)
20. Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta*. 2008; 29:S67–S72. PMID: [18093648](#)
21. Martinon F, Petril V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006; 440:237–241. PMID: [16407889](#)
22. Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res*. 2011; 4:39–49. doi: [10.2147/JIR.S11330](#) PMID: [22096368](#)

23. Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, et al. Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193:921–927. PMID: [16157088](#)
24. Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstetter A, Agostini A, Capelle M, et al. Preeclampsia: impaired inflammatory response mediated by Toll-like receptors. *J Reprod Immunol*. 2008; 78:80–83. PMID: [18023484](#)
25. Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci*. 2008; 15:231–242. doi: [10.1177/1933719108316391](#) PMID: [18421019](#)
26. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296:301–305. PMID: [11951032](#)
27. Yang CS, Shin DM, Jo EK. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *Int Neurol J*. 2012; 16: 2–12. doi: [10.5213/inj.2012.16.1.2](#) PMID: [22500248](#)
28. Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*. 2005; 26:447–454. PMID: [15967716](#)
29. Grishman EK, White PC, Savani RC. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 β in the development and progression of type 1 diabetes. *Pediatr Res*. 2012; 71:626–632. doi: [10.1038/pr.2012.24](#) PMID: [22337228](#)
30. Haneklaus M, O'Neill LA, Coll RC. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25: 40–5. doi: [10.1016/j.coi.2012.12.004](#) PMID: [23305783](#)
31. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP-3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*. 2007; 14:1583–1589.
32. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Núñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*. 2009; 10:241–247. doi: [10.1038/ni.1703](#) PMID: [19221555](#)
33. Conforti-Andreoni C, Spreafico R, Qian HL, Riteau N, Rytzel B, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. *J Immunol*. 2011; 187:5842–5850. doi: [10.4049/jimmunol.1101408](#) PMID: [22058415](#)
34. Rock KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. *Nat Rev Rheumatol*. 2013; 9:13–23. doi: [10.1038/nrnheum.2012.143](#) PMID: [22945591](#)
35. Mulia MJ, Myrtoli K, Potter J, Boeras C, Kavathas PB, Stakianaki 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; 65:542–548. doi: [10.1111/j.1600-0697.2010.00960.x](#) PMID: [21352397](#)
36. Pontillo A, Reis EC, Bricher PN, Vianna P, Diniz S, Fernandes KS, et al. NLRP1 L155H Polymorphism is a Risk Factor for Preeclampsia Development. *Am J Reprod Immunol*. 2014 Dec 29. doi: [10.1111/ajl.12353](#)
37. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968; 97:77–89. PMID: [4179068](#)
38. Li CY, Lam KW, Yam LT. Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem*. 1973; 21:1–12. PMID: [4694536](#)
39. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinform*. 2005; 6:62.
40. Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, Núñez G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007; 82:220–225. PMID: [17442855](#)
41. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*. 2004; 384:201–232. PMID: [15450003](#)
42. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29:707–735. doi: [10.1146/annurev-immunol-031210-101405](#) PMID: [21219188](#)
43. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012; 481: 278–286. doi: [10.1038/nature10759](#) PMID: [22258606](#)
44. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010; 140:821–832. doi: [10.1016/j.cell.2010.01.040](#) PMID: [20303873](#)
45. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol*. 2009; 187:61–70. doi: [10.1083/jcb.200903124](#) PMID: [19805629](#)

46. The information in DNA determines cellular function via translation. Scitable-Nature Education. Available: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-information-in-dna-determines-cellular-function-6523228>.
47. Siljee JE, Wortelboer EJ, Koster MP, Imholz S, Rodenburg W, Visser JH, et al. Identification of interleukin-1 beta, but no other inflammatory proteins, as an early onset pre-eclampsia biomarker in first trimester serum by bead-based multiplexed immunoassays. *Prenat Diagn*. 2013; 33:1183–1188. doi: [10.1002/pd.4219](https://doi.org/10.1002/pd.4219) PMID: [23943085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23943085/)
48. Cheng SB, Sharma S. Interleukin-10: A pleiotropic regulator in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2014; Oct1. doi: [10.1111/ajr.12329](https://doi.org/10.1111/ajr.12329)
49. Moore KW, de WaalMalefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:683–765. PMID: [11244051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11244051/)
50. Marzi M, Vigano A, Trabattini D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol*. 1996; 106:127–133. PMID: [8870710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8870710/)
51. Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 54:30–37. PMID: [15948770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15948770/)
52. Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol*. 2013; 25:439–448. doi: [10.1016/j.smim.2013.10.014](https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.014) PMID: [24275802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24275802/)
53. Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis*. 2003; 187: S370–384. PMID: [12792854](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12792854/)
54. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:519–550. doi: [10.1146/annurev.immunol.021908.132612](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612) PMID: [19302047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19302047/)
55. Klimkiewicz-Blok D, Florjanski J, Zalewski J, Blok R. Analysis of the concentrations of interleukin 18 in amniotic fluid in the second and the third trimesters of pregnancy. *Adv Clin Exp Med*. 2013; 22:699–703. PMID: [24285455](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24285455/)
56. Ciraci C, Janczy JR, Sutterwala FS, Cassel SL. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. *Microbes Infect*. 2012; 14:1263–1270. doi: [10.1016/j.micinf.2012.07.007](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.007) PMID: [22841804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22841804/)
57. Dinarello CA. IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 3:11–24.
58. Lasigle D, Traggiai S, Federici M, Alessio M, Buoncompagni A, Accogli A, et al. Role of IL-1beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients. *Plos One*. 2011; 6:e20014. doi: [10.1371/journal.pone.0020014](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020014) PMID: [21637346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21637346/)
59. Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzelak B, et al. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2012; 93:75–81. doi: [10.1016/j.jri.2012.01.006](https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.01.006) PMID: [22370101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22370101/)
60. Toldi G, Rigó J Jr, Stenczer B, Vársárhelyi B, Molvarec A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 66:223–229. doi: [10.1111/j.1600-0897.2011.00987.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.00987.x) PMID: [21306467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21306467/)
61. Beckmann I, Efrain 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; 23:319–329. PMID: [15617632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15617632/)
62. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, et al. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:10193–10197. PMID: [8234276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8234276/)
63. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Liu XD, Brabcova I, Sekerkova A, et al. Epithelial cells modulate genes associated with NF kappa B activation in co-cultured human macrophages. *Immunobiology*. 2011; 216:1110–1116. doi: [10.1016/j.imbio.2011.04.009](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.04.009) PMID: [21601940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21601940/)
64. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:693–733. doi: [10.1146/annurev.immunol.021908.132641](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641) PMID: [19302050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19302050/)
65. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappa B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 2009; 183:787–791. doi: [10.4049/jimmunol.0901363](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363) PMID: [19570822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19570822/)



CAPÍTULO II

DAMPs induzem inflamação em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Mariana Romão-Veiga¹; Mariana Leticia Matias²; Vanessa Rocha Ribeiro²; Priscila Rezeck Nunes²; Vera Therezinha Medeiros Borges²; João Pessoa Araújo Junior¹; José Carlos Peraçoli²; Maria Terezinha Serrão Peraçoli¹

¹ Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, SP, Brasil.

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, SP, Brasil.

RESUMO

A pré-eclampsia (PE) é a principal causa de morbidade e mortalidade tanto materna como fetal. O plasma dessas gestantes contém níveis elevados de estruturas moleculares associadas ao estresse e morte celular (DAMPs), como hialurona (HA) e proteínas de choque térmico (HSP) as quais podem interagir com receptores presentes em células da imunidade inata e ativar um complexo intracelular que promove a inflamação, denominado inflamassoma. O presente estudo teve por objetivo avaliar o envolvimento das DAMPs, HA e Hsp70 na ativação dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em monócitos. Foram estudadas 20 gestantes portadoras de PE, 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres não-grávidas (MNG). O sangue periférico coletado foi centrifugado e o plasma armazenado a -80°C para dosagem das DAMPs (HA, Hsp70 e High mobility group Box 1 (HMGB1)). Monócitos de sangue periférico foram incubados na presença ou ausência das DAMPs (HA e Hsp70) e o sobrenadante obtido após 18h de cultivo foi utilizado para dosagem das citocinas Interleucina-1 β (IL-1 β), IL-18 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por ELISA. A presença de inflamassoma foi avaliada pela quantificação de RNAm de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , IL-18, HMGB1 e TNF- α por RT-qPCR. Os resultados mostraram concentração plasmática de HA, Hsp70 e HMGB1 e expressão gênica endógena de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α e HMGB1 significativamente maiores em gestantes com PE em comparação às GN e MNG. Em relação à produção endógena de citocinas pelos monócitos, IL-1 β foi maior no grupo PE em relação aos grupos GN e MNG, enquanto IL-18 e TNF- α foram aumentadas apenas no grupo PE comparado ao grupo GN. Quando os monócitos foram estimulados com HA observou-se aumento da expressão de RNAm de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α e HMGB1, enquanto Hsp70 estimulou apenas a expressão de RNAm de TNF- α . Todos os grupos apresentaram aumento de IL-1 β após estímulo com HA e aumento de IL-1 β e TNF- α quando estimulados com Hsp70. A maior expressão gênica endógena de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , HMGB1 e TNF- α em monócitos de gestantes pré-eclâmpicas confirma o estado de ativação dessas células na PE. A maior expressão gênica do inflamassoma induzido com HA sugere que essa DAMP pode contribuir para a ativação desse complexo em monócitos de gestantes com PE. Apesar de Hsp70 não induzir ativação do inflamassoma, contribuiu para produção de IL-1 β e TNF- α pelos

monócitos. Esses resultados sugerem a participação dessas DAMPs no processo inflamatório observado na PE.

1. INTRODUÇÃO

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).

Durante a gestação humana a principal causa de morbidade, mortalidade e parto prematuro entre 2 a 10% das gestações (ACOG, 2002), é a pré-eclâmpsia (PE), uma síndrome específica da gravidez. Os parâmetros clínicos que identificam o desenvolvimento dessa patologia são: hipertensão arterial ($PA \geq 140 \times 90$ mmHg) e proteinúria (≥ 300 mg/24h) (NHBPEP, 2000) que se manifestam a partir da vigésima semana de gestação ou nos primeiros dias após o parto. Outras disfunções maternas também estão relacionadas com PE, como insuficiência renal, envolvimento hepático, complicações neurológicas ou hematológicas, disfunção útero-placentária ou restrição de crescimento fetal (Tranquilli et al., 2014; Mol et al., 2016).

Na PE ocorre uma reação inflamatória sistêmica exacerbada que inclui ativação de células inflamatórias, como monócitos e granulócitos, bem como células endoteliais, que são parte do sistema inflamatório (Schuiling et al., 1997; Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006). Essa patologia é caracterizada por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Johnson et al., 2002; Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007) bem como por alterações na produção de citocinas reguladoras, como interleucina-10 (IL-10) e fator transformador do crescimento beta (TGF- β) (Pestka et al., 2004; Peraçoli et al., 2008; Raghupathy, 2013). A produção endógena de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por monócitos do sangue periférico está significativamente mais elevada em gestantes pré-eclâmpticas do que em gestantes normais, sugerindo o estado de ativação dessas células (Peraçoli et al., 2007; 2011; Cristofalo et al., 2013).

A ativação de leucócitos no sangue periférico de gestantes com PE está associada a genes relacionados à inflamação. Esses leucócitos apresentam hiper-regulação do gene da cadeia leve de NF- κ B (NF- κ B-1A) em gestantes com PE (Lok

et al., 2009), ocorrendo também associação entre aumento de ativação do NF- κ B e maior produção de TNF- α e IL-1 β por células mononucleares de gestantes pré-eclâmplicas em comparação a gestantes normotensas (Giorgi et al., 2012). A produção mais elevada de TNF- α e IL-1 β em gestantes com PE sugere que os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes de TNF- α e IL-1 β podem estar associados às manifestações mais graves da PE.

A resposta inflamatória sistêmica intensa na PE parece estar relacionada com a liberação de substâncias capazes de induzir inflamação como componentes celulares presentes no plasma, derivados de proteínas, polissacarídeos e lipídeos, bem como produtos da matriz extracelular, os quais são denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e considerados importantes moduladores da resposta inflamatória. As DAMPs são representadas por moléculas como ácido úrico (Matias et al., 2015), reativos intermediários do oxigênio, proteínas de choque térmico (HSPs) (Asea et al., 2002; Mandrekar et al., 2008), proteínas liberadas de células como HMGB1 (Park et al., 2004) e produtos liberados da matriz extracelular, como fibronectina e hialurona (Okamura et al., 2001; Campo et al., 2010; Saïd-Sadier & Ojcius, 2012).

As Hsps são moléculas ubiquitárias e filogeneticamente conservadas, com funções de chaperonas e com atividade citoprotetora (Hightower, 1991), presentes em todos os organismos (Njemini et al., 2003). A indução de estresse oxidativo leva à produção de Hsp70, que regula a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a expressão do gene do TNF- α em monócitos e macrófagos (Mandrekar et al., 2008). Além disso, a liberação de Hsp70 por monócitos/macrófagos atua como “sinal de perigo” estimulando a produção de TNF- α , IL-6 e IL-8 por linhagens de macrófagos humanos, THP-1 (Lee et al., 2013). Concentração sérica elevada de Hsp70 é descrita em gestantes portadoras de PE precoce, sendo esses resultados significativamente maiores do que os obtidos em gestantes portadoras de PE tardia (Peracoli et al., 2013).

High mobility group Box 1 (HMGB1) é uma proteína previamente descrita como estritamente nuclear, devido a sua ligação ao DNA e papel na transcrição, reparação e replicação de genes (Bustin, 1999) e posteriormente considerada como citocina com potente atividade inflamatória, devido suas funções extranucleares (Holmlund et al., 2007). Em condições inflamatórias ou de lesão, HMGB1 pode ser

secretada ativamente por células da imunidade inata como macrófagos e monócitos e, passivamente pelas células necróticas, sendo considerada “sinal de perigo” (Wang et al., 2004). A literatura demonstra ainda que a liberação de HMGB1 em endotoxemia é dependente da ativação do inflamassoma NLRP3 (Lamkanfi et al., 2010). Cultura de monócitos estimulados com HMGB1 resulta na liberação de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-8, mas não de IL-10 ou IL-12 por essas células (Andersson et al., 2000). HMGB1 está aumentada no plasma de gestante com PE quando comparadas com gestantes normotensas (Naruse et al., 2012), sendo descrito que pode contribuir para o desenvolvimento da resposta inflamatória em pacientes com PE (Zhu et al., 2015).

O hialurona (HA) é um glicosaminoglicano da matriz extracelular, que em ambientes inflamatórios sofre rápida degradação, resultando no acúmulo de fragmentos com baixo peso molecular (Fraser et al., 1997; Campo et al., 2010). Esses fragmentos ativam a resposta pró-inflamatória via Toll-like receptor (TLR) 2 e TLR4, agindo como DAMP, além de poder ativar o inflamassoma NLRP3 (Yamazaki et al., 2009). Por outro lado, o HA de alto peso molecular gera resposta anti-inflamatória (Taylor et al., 2004; Scheibner et al., 2006; Stern et al., 2006). Níveis plasmáticos elevados de HA são descritos em gestantes portadoras de PE e eclâmpsia (Berg et al., 2001; Romão et al., 2014).

As DAMPs exercem seu efeito inflamatório por meio da interação com receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos em células da imunidade inata. Esses receptores são considerados componentes centrais do sistema imune inato e estão envolvidos na resposta inflamatória de monócitos (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Os principais são os receptores semelhantes ao Toll (TLRs), que reconhecem e ligam moléculas presentes na superfície de patógenos (Koga & Mor, 2008), além de produtos endógenos de células do hospedeiro, que são liberados durante lesão tecidual e denominados “alarminas” ou DAMPs (Matzinger, 2002; Kim et al., 2005). Assim a ativação dos TLRs por microrganismos ou por produtos endógenos pode regular tanto a fagocitose e atividade microbicida, como também a liberação de citocinas inflamatórias (Krutzik et al., 2005).

Outros receptores PRRs compreendem os membros da família de receptores Nod-like ou NLR (proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica), que

são proteínas citosólicas que reconhecem PAMPs e DAMPs dentro do citoplasma da célula do hospedeiro e recrutam outras proteínas, formando complexos de sinalização que promovem a inflamação e são denominados inflamassomas, gerando formas ativas de IL-1 β (Franchi et al., 2009).

Após interação com as DAMPs, diversas proteínas NLRP3 idênticas formam um oligômero e cada NLRP3 do oligômero se liga a uma proteína adaptadora chamada ASC. Esta se liga à forma precursora inativa da enzima caspase-1 que é uma protease de cisteinilaspártato, importante nos mecanismos de apoptose e inflamação (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004). A caspase-1 é uma importante proteína inflamatória sintetizada na forma de pró-caspase-1 e se torna biologicamente ativa quando o inflamassoma inicia seu processo de formação (Strowig et al., 2012; Davis et al., 2011) sendo responsável por clivar a pró-IL-1 β e a pró-IL-18 em IL-1 β e IL-18 biologicamente ativas que, subsequentemente, são secretadas para o meio extracelular (Dinarello, 1999; Pétrilli et al., 2007; Eder, 2009; Franchi et al., 2009).

A ativação do inflamassoma NLRP3 é importante para a defesa do hospedeiro e eliminação de patógenos como fungos, bactérias e vírus, sendo os produtos de sua ativação, IL-1 β e IL-18 moléculas protetoras em várias infecções (Dinarello & Fantuzzi, 2003; Dinarello, 2009). Também é ativado em condições de estresse celular ou injúria (Yang et al., 2012). Além disso, algumas evidências indicam que o NLRP3 tem importante papel em doenças inflamatórias como aterosclerose, gota e diabetes tipo I (Dewell et al., 2010; Grishman et al., 2011; Kingsbury et al., 2012). Entretanto, os diferentes ligantes e o mecanismo exato da ativação do inflamassoma NLRP3 ainda não estão bem esclarecidos (Strowig et al., 2012). Várias moléculas endógenas, consideradas sinais de perigo, tais como cristais de ácido úrico, cristais de colesterol, hialurona, radicais livres derivados do oxigênio e ácidos graxos, quando em altas concentrações, induzem ativação do inflamassoma NLRP3, desempenhando papel importante em doenças inflamatórias. Monócitos de gestantes pré-eclâmpicas apresentam hiperativação endógena do complexo inflamassoma, representada por maior expressão gênica e proteica de NLRP3, caspase-1, IL-1 β e de TNF- α em comparação às gestantes normotensas (Matias et al., 2015). Segundo Yang et al. (2012), uma melhor compreensão da natureza específica desse inflamassoma seria importante para revelar a

fisiopatologia molecular de várias doenças inflamatórias e para identificar terapêuticas potenciais para controle dessas doenças.

Os dados da literatura demonstram que a PE apresenta resposta inflamatória exacerbada, representada pela ativação de células da imunidade inata. Assim, o conhecimento das vias do inflamassoma em monócitos ativados pelas DAMPs, presentes no plasma e o perfil de citocinas produzido por monócitos, detectados no sangue periférico de gestantes portadoras de PE poderão contribuir para a melhor compreensão do envolvimento da imunidade inata na fisiopatologia dessa importante patologia da gestação.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o envolvimento das DAMPs, hialurona e Hsp70 na ativação dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em monócitos de gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não-grávidas.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1. Casuística

Foram estudadas 20 gestantes portadoras de PE (grupo de estudo) e 20 gestantes normotensas (grupo controle) que realizaram assistência pré-natal na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Também foram incluídas no estudo 20 mulheres saudáveis, não-grávidas, doadoras voluntárias do Banco de Sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

As gestantes foram consideradas portadoras de PE quando, sem antecedente, 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. Para as gestantes com idade menor que 18 anos o termo foi assinado também por seus pais ou responsáveis. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo nº 349.847).

2.2. Colheita de sangue

Foram coletados 10 mL de sangue por punção venosa para avaliação da expressão gênica e produção de citocinas por monócitos de gestantes portadoras de PE no momento do diagnóstico da doença e, de gestantes normotensas no momento em que foram pareadas com as gestantes com PE. O sangue das mulheres não-grávidas foi obtido durante a doação de sangue.

2.3. Separação do plasma

Sangue periférico foi colhido por punção venosa, sendo 10 mL colocados em tubo estéril contendo 10 U/mL de EDTA (Greiner bio-one, Americana - Brasil), após centrifugação a 1500 rpm por 10 min, o plasma obtido foi armazenado a -80°C até o momento da determinação das DAMPs (Hialurona, Hsp70 e HMGB1) por ELISA.

2.4. Isolamento e cultura de monócitos

Após separação do plasma, as células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), segundo técnica previamente descrita (Peracoli et al., 2011). O anel rico em células mononucleares foi lavado duas vezes com meio de cultura RPMI por 10 min a 1500 rpm. Após esse procedimento, as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco BRL Life Technologies, Breda, The Netherlands). Para identificação dos monócitos, 50 µL da suspensão de células mononucleares foram incubados por 10 min a 37°C com 450 µL da solução de vermelho neutro a 0,02%. Os monócitos foram diferenciados por apresentarem citoplasma de coloração vermelha e a concentração celular foi ajustada para 5×10^5 monócitos viáveis/mL. As células foram distribuídas em placas de cultura de 24 orifícios (Linbro, Flow Lab, USA) e incubadas por 90 min a 37°C, em tensão de 5% de CO₂. As células não-aderentes foram eliminadas por lavagem dos orifícios da placa com meio de cultura RPMI.

2.5. Obtenção de sobrenadante de cultura de monócitos

Os monócitos obtidos conforme descrito no item 2.4., foram incubadas a 37°C, em tensão de 5% de CO₂ por 18h, na ausência ou presença de 2,5 ng/mL Hsp70 (Sigma) e 100 µg/mL Hialurona (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). O sobrenadante obtido após 18h de cultivo foi aspirado, centrifugado e distribuído em alíquotas, conservadas a - 80°C até o momento da dosagem pela técnica de ELISA.

2.6. Determinação das DAMPs e das citocinas pela técnica de ELISA

Para quantificação das DAMPs (HA, Hsp70) no plasma e das citocinas IL-1β e TNF-α nos sobrenadantes de cultura de monócitos, tratados ou não com HA e/ou Hsp70, foram empregados kits comerciais específicos obtidos da R&D Systems. A IL-18 foi quantificada em plasma com kit MBL (MBL-Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan). O HMGB1 foi quantificado em plasma utilizando kit IBL Internacional – Shino Test (Hamburg, Germany). Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonais e policlonais, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas-padrão, foram recomendadas pelo fabricante. O limite de sensibilidade dos kits foi de 0,4 ng/mL para hialurona, 125 pg/mL para Hsp70, 0,1 ng/mL para HMGB1, 3,9 pg/mL para IL-1β, 25,6 pg/mL para IL-18 e 15,6 pg/mL para TNF-α.

2.7. Avaliação da expressão de transcritos relacionados à inflamação

Os monócitos foram submetidos à análise da expressão em nível transcricional dos genes que codificam as proteínas NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β, IL-18 e TNF-α. O RNA total dos monócitos foi extraído por meio do sistema Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, ONL2V4Y6, Canada), conforme protocolo do fabricante. Após a extração, a fim de garantir a completa remoção de DNA genômico, 1µg de RNA total foi incubado com DNase I Amp Grade (Invitrogen®). A pureza e qualidade relativa de todas as amostras de RNA total obtidas foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop® 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™. Posteriormente, a síntese de DNA complementar (cDNA) para execução da Reação em Cadeia da Polimerase acoplada a transcrição reversa (Reverse Transcription-coupled Polymerase Chain Reaction – RT-PCR) foi realizada com 450ng de RNA total por 60µl de reação,

utilizando ImProm-IITM Reverse Transcription System, conforme protocolo do fabricante.

A quantificação da expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , IL-18 e TNF- α foi efetuada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) utilizando GoTaq[®] RT-qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). O aparelho utilizado foi 7500 Fast Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA).

As diversas variantes dos alvos estudados foram alinhadas no programa MEGA 5.05 e, posteriormente, cada iniciador foi escolhido por meio do programa Primer-BLAST. Iniciadores situados na junção éxon-éxon garantem a pureza da reação, ou seja, a ausência de qualquer DNA genômico que possa contaminá-la. As sequências dos iniciadores utilizadas no presente estudo estão detalhadas no quadro 1.

Cada reação foi definida em duplicata no total de 20 μ l cada, o qual contém 0,3 μ M de cada iniciador (sense e anti-sense), 2 μ l de cDNA, 10 μ l de master mix e 6,8 μ l de água livre de nuclease. Adicionalmente, foi inserido um controle, também em duplicata, o qual foi incluído em cada reação a fim de provar que não há contaminação. As condições para a reação de RT-qPCR foram: denaturação inicial a 96°C-2min e 40 ciclos a 95°C-15s e 60°C-60s, seguido de uma curva melting. A amplificação de cada transcrito específico foi confirmada pelo perfil da curva melting gerada no final de cada reação.

Quadro 1: Sequências dos iniciadores para a análise da expressão dos genes caspase-1, IL-1 β , IL-18, NLRP1, NLRP3 e TNF- α em estudo por RT-qPCR.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer(5'-3')	GeneBank
<u>NLRP1</u>	(1728)TCCGGCTCCCATAGACAGA(1747)	(1810)AGACCCATCCTGGCTCATCT(1791)	NM_033004.3
<u>NLRP3</u>	(2826)GAGGAAAAGGAAGGCCGACA(2845)	(2917)TGGCTGTTCAACCAATCCATGA(2897)	NM_004895.4
<u>CASP1</u>	(1065)AGACATCCACAATGGGCTC(1084)	(1172)TGAAAATCGAACCTTGCAGAAA(1151)	NM_033292.3
<u>IL1B</u>	(544)GAGCAACAAGTGGTGTCTCC(564)	(653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)	NM_000576.2
<u>IL18</u>	(438)ACTGTAGAGATAATGCACCCCG(459)	(517)AGTTACAGCCATACCTCTAGGC(496)	NM_001562.3
<u>TNF</u>	(325)GCTGCACTTTGGAGTGATCG(344)	(462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)	NM_000594.3
<u>HMGB1</u>	(1404)TACGAAAAGGATATTGCTGC(1423)	(1505)CTCCTCTTCCTCTTTTCTTG(1484)	NM_001313893.1
<u>GAPDH</u>	(684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703)	(801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	NM_002046.4

Os valores de expressão dos transcritos analisados foram normalizados com base na análise concomitante da expressão do gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O cálculo da expressão diferencial dos genes selecionados foi efetuado pelo método de processamento de dados em relação a uma curva padrão (Larionov et al., 2005). Todas as condições, inclusive o GAPDH de cada amostra e o controle negativo da reação (No template Control – NTC; sem DNA) foram analisadas em duplicatas. Para análise da expressão relativa, amostras de RNA obtidas de gestantes do grupo controle foram reunidas e, após análise da expressão gênica, essa amostra recebeu o valor relativo de 100. Todas as outras amostras receberam valores relativos a essa amostra.

2.8. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância, empregando-se testes não-paramétricos (Teste *U* de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn), segundo o programa estatístico PRISM, (Graph Prism for Windows, version 6.01, GraphPad, CA, EUA). O nível de significância adotado para todos os testes realizados foi de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Características clínicas dos grupos estudados

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

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais.

Características		Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (n = 20)	Gestantes normotensas (n = 20)	Mulheres não grávidas (n = 20)
Idade (anos)		25 (15 – 40)	26 (14 – 41)	24 (21 – 40)
Cor	Branca (%)	82,3	89,3	84,0
	Não-branca (%)	17,7	10,7	16,0
Idade gestacional (semanas)		34 (24 – 40)	35 (23 – 39)	–
Paridade	Nulípara (%)	63	68	–
	Multípara (%)	37	32	–
Pressão arterial sistólica (mmHg)		160 [#] (140 – 200)	110 (90 – 112)	114 (100 – 120)
Pressão arterial diastólica (mmHg)		110 [#] (90 – 120)	69 (63 – 70)	70 (65 – 80)
Proteinúria (mg / 24h)		1510* (300 – 19800)	< 300	ND
Ácido úrico (mg/dL)		5,8 [#] (4,5 – 10,1)	3,8 (2,2 – 4,6)	4,1 (2,8 – 4,8)

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

3.2. Concentração das DAMPs (hialurona, Hsp70 e HMGB1) no plasma

Na Tabela 2 estão representadas as concentrações plasmáticas de HA, Hsp70 e HMGB1. Os níveis dessas DAMPs foram significativamente maiores no plasma de gestantes portadoras de PE quando comparadas com gestantes normotensas e mulheres não grávidas.

Tabela 2. Concentrações das DAMPs em plasma.

Parâmetros	Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia	Gestantes Normotensas	Mulheres não grávidas
Hialurona (ng/mL)	135,5 [#]	62,4	42,8
	(20,4 – 296,8)	(2,5 – 199,7)	(3,3 – 165,0)
Hsp70 (pg/mL)	907,1 [#]	680,23	655,43
	(404,63 – 1272,8)	(7,5 – 1090,4)	(12,7 – 1083,4)
HMGB1 (ng/mL)	8,11 [#]	2,09	2,15
	(1,864 – 97,809)	(1,682 – 4,789)	(1,848 – 18,854)

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

(p<0,05) vs gestantes normotensas e mulheres não grávidas (teste de Kruskal-Wallis).

3.3. Expressão de genes relacionados ao inflamassoma em monócitos estimulados ou não com Hialurona

A expressão gênica de NLRP1 e NLRP3 (fig 1A e 1B) encontra-se aumentada em monócitos de gestantes portadoras de PE, estimulados ou não com HA, quando comparado com os grupos GN e MNG. Também é possível notar menor expressão dos genes NLRP1 e NLRP3 em monócitos de GN, estimulados ou não com HA, quando comparado com o grupo MNG. O grupo PE apresentou diferença significativa entre monócitos não estimulados (HA-) e estimulados (HA+) com aumento da expressão de NLRP1 e NLRP3 nos estimulados.

Observa-se ainda na figura 1C, que a expressão do gene da caspase-1 em monócitos de gestantes com PE, estimulados ou não com HA, foi maior quando comparada com os grupos GN e MNG. Além disso, monócitos de gestantes normotensas, estimulados ou não com HA, tiveram menor expressão de caspase-1 em comparação com o grupo de mulheres não grávidas. Os grupos PE e MNG apresentaram diferença significativa entre monócitos não estimulados (HA-) e estimulados (HA+) com aumento da expressão de caspase-1 nos estimulados. O tratamento das células com 200 μ M de glibenclamida, composto capaz de inibir o inflamassoma NLRP3, induziu menor expressão de caspase-1 por monócitos de mulheres não-grávidas, mesmo quando estimulados com HA (HA+) (fig 1D).

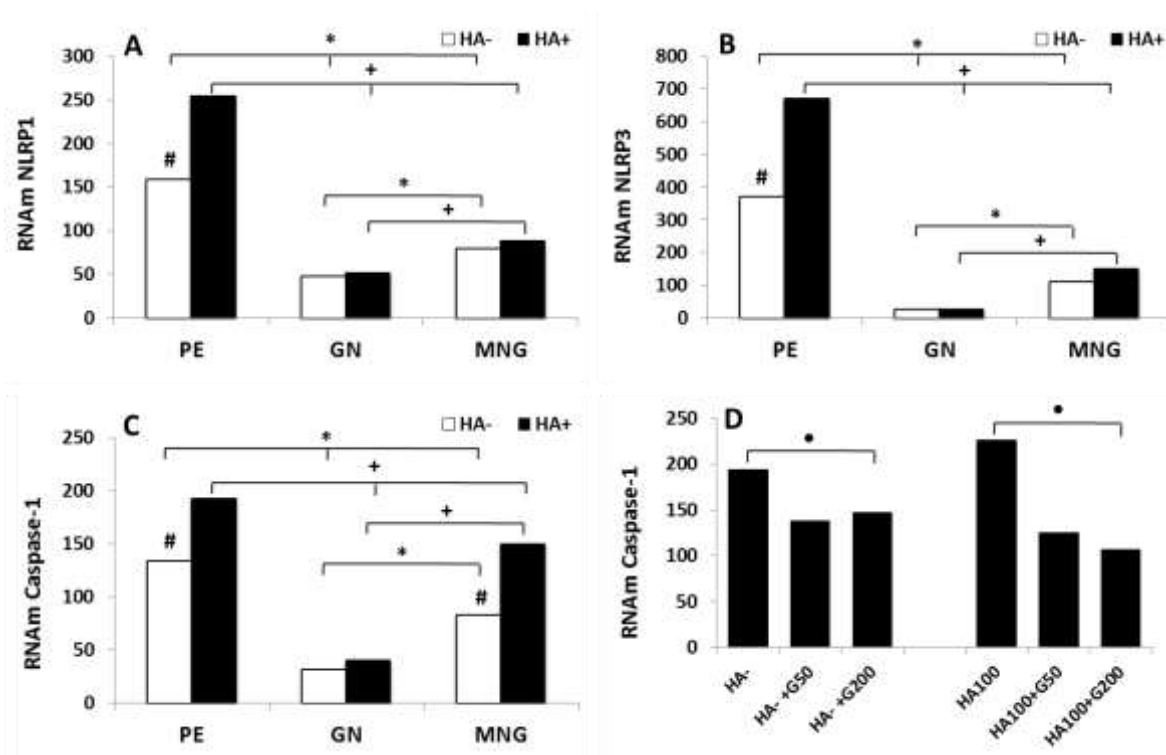


Figura 1: Expressão gênica de NLRP1 (A), NLRP3 (B) e caspase-1 (C) em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normotensas (GN) e mulheres não grávidas (MNG), estimulados ou não com Hialurona (HA). Expressão de caspase-1 (D) por monócitos de mulheres não grávidas cultivados com 50 μM ou 200 μM de glibenclamida e estimulados ou não com HA. * p<0,05 entre os grupos HA-; + p<0,05 entre os grupos HA+; # p<0,05 entre HA- e HA+; • p<0,05 entre os tratamentos (teste de Kruskal-Wallis).

O aumento da expressão gênica da citocina IL-1β (fig 2A) é observado em monócitos de gestantes portadoras de PE, estimulados ou não com HA, quando comparado com os grupos GN e MNG. Além disso, é possível notar diminuição na expressão do gene IL-1β em monócitos de GN, estimulados ou não com HA, quando comparado com o grupo MNG. Foi demonstrado ainda que o estímulo com hialurona (HA+) induz aumento da expressão gênica de IL-1β em monócitos de gestantes com PE e no grupo MNG.

Com relação a IL-18 (fig 2B) observa-se maior expressão em monócitos de gestantes com PE, estimulados ou não com HA, em comparação com o grupo GN. Além disso, monócitos do grupo GN estimulados com HA, apresentaram menor expressão gênica dessa citocina em relação ao grupo MNG.

Observa-se ainda que 200 μM de glibenclamida foi capaz de inibir a expressão de IL-1β por monócitos de mulheres não-grávidas, mesmo quando estimulados com HA (HA+) (fig 2C).

A expressão gênica de HMGB1 (fig 2D) foi maior em monócitos de gestantes portadoras de PE, estimulados ou não com HA, quando comparado ao grupo GN. Menor expressão desse gene foi detectada em monócitos de GN, estimulados ou não com HA em comparação com o grupo MNG. Observa-se ainda que o HA foi capaz de estimular a expressão gênica de HMGB1 no grupos PE e MNG.

Na figura 2E observa-se grande aumento da expressão gênica de TNF- α em monócitos de gestantes com PE, estimulados ou não com HA, quando comparados com os grupos de GN e MNG. No entanto, o grupo de gestantes normotensas apresentou menor expressão de TNF- α em monócitos estimulados com HA (HA+) do que no grupo MNG. Além disso, observa-se diferença significativa entre a expressão gênica de TNF- α em monócitos não estimulados (HA-) e estimulados com HA (HA+), de gestantes com PE e de MNG.

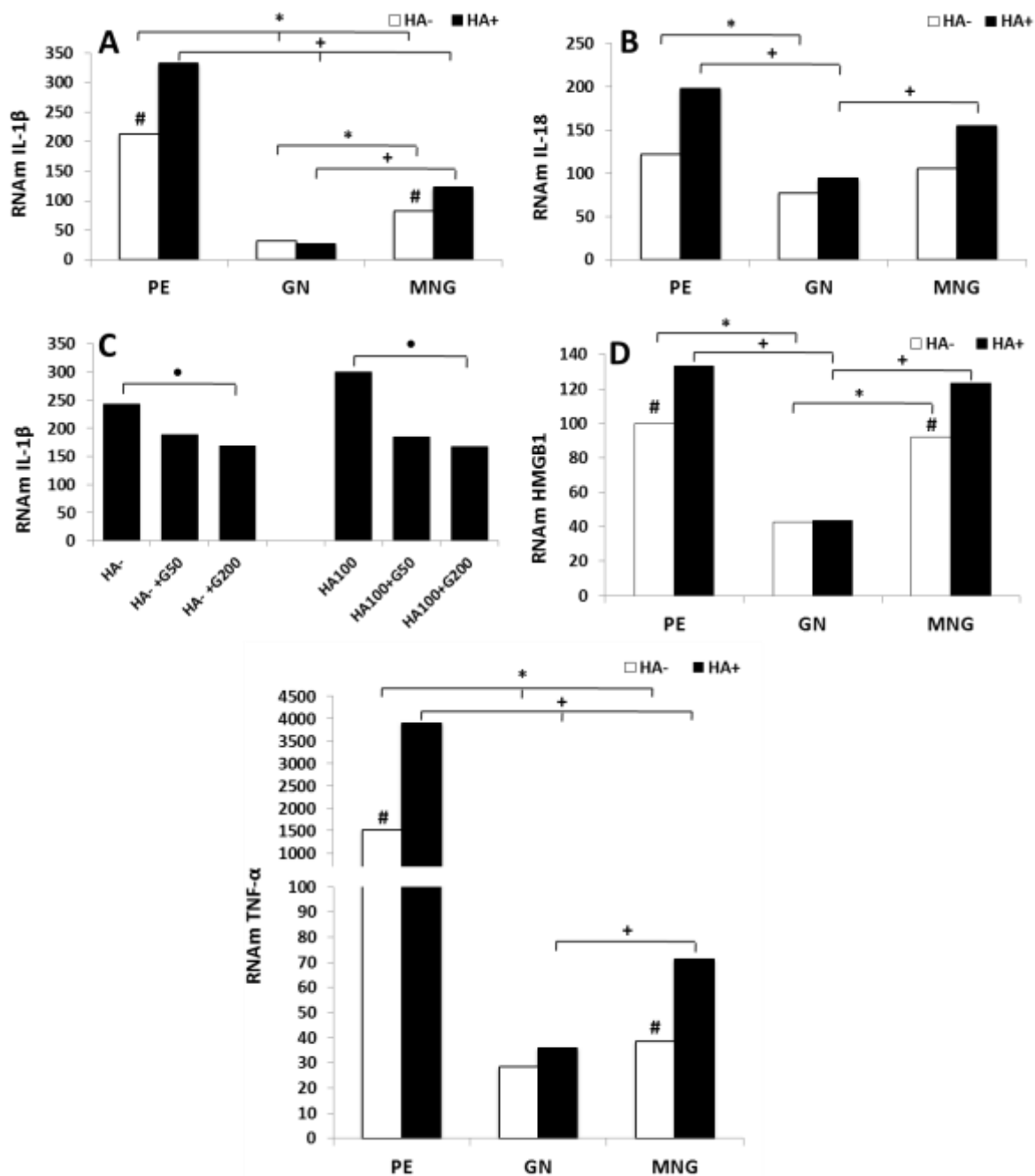


Figura 2: Expressão gênica de IL-1 β (A), IL-18 (B), HMGB1 (D) e TNF- α (E) em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normotensas (GN) e mulheres não grávidas (MNG), estimulados ou não com Hialurona (HA). Expressão de IL-1 β (C) por monócitos de mulheres não grávidas cultivados com 50 μ M ou 200 μ M de glibenclamida e estimulados ou não com HA. * $p < 0,05$ entre os grupos HA-; + $p < 0,05$ entre os grupos HA+; # $p < 0,05$ entre HA- e HA+; • $p < 0,05$ entre os tratamentos (teste de Kruskal-Wallis).

3.4. Produção de citocinas por monócitos estimulados ou não com Hialurona

Na figura 3A observa-se produção endógena de IL-1 β , produzida por monócitos de gestantes portadoras de PE significativamente mais elevada em

relação aos grupos GN e MNG. O estímulo com HA induziu maior produção de IL-1 β pelas células de gestantes pré-eclâmplicas apenas quando comparada ao grupo GN. Também é possível notar diminuição dos níveis da citocina em monócitos de GN estimulados com HA na comparação com o grupo MNG. Além disso, observa-se diferença significativa entre a produção de IL-1 β por monócitos dos três grupos estudados, estimulados com HA (HA+) e a produção basal de citocina por essas células.

Observou-se aumento da produção de IL-18 por monócitos de gestantes com PE não estimulados com HA, em relação ao grupo GN (Figura 3B). Nota-se também diminuição nos níveis da citocina por monócitos de GN, não estimulados com HA, quando comparada com o grupo MNG. No entanto, observou-se produção significativamente menor de IL-18 por monócitos de gestantes com PE e de mulheres não grávidas estimulados com HA (HA+) quando comparados com a produção por células que não foram estimuladas (HA-).

Na figura 3C observa-se maior produção endógena e estimulada com HA de TNF- α por monócitos de gestantes portadoras de PE em relação ao grupo GN. Também é possível notar menor liberação da proteína TNF- α por monócitos de gestantes normotensas, estimulados ou não com HA, quando comparado com o grupo MNG. Além disso, monócitos de mulheres não grávidas estimulados com HA apresentaram maior produção de TNF- α em relação à produção basal por essas células. Não houve diferença significativa entre os níveis basais e estimulados por HA em monócitos de gestantes pré-eclâmplicas.

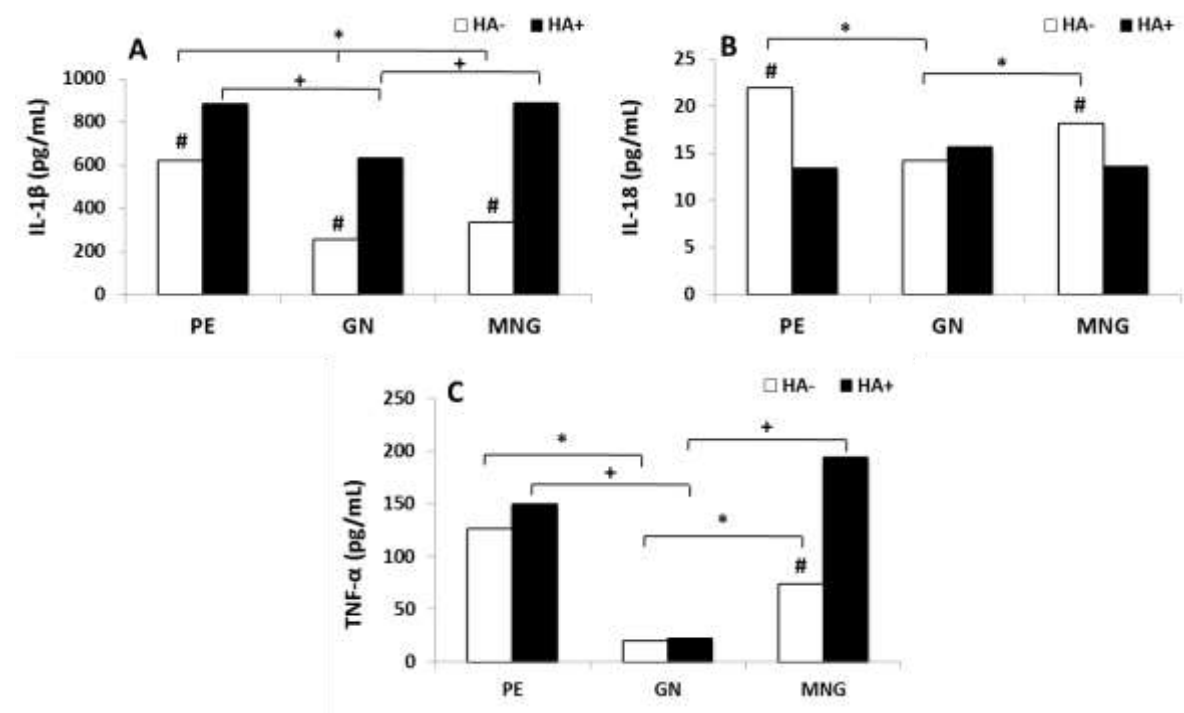


Figura 3: Produção de IL-1 β (A), IL-18 (B) e TNF- α (C) por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normotensas (GN) e mulheres não grávidas (MNG), estimulados ou não com Hialurona (HA). * p<0,05 entre os grupos HA-; + p<0,05 entre os grupos HA+; # p<0,05 entre HA- e HA+ (teste de Kruskal-Wallis).

3.5. Expressão de genes relacionados ao inflamassoma em monócitos estimulados ou não com Hsp70

A expressão gênica de NLRP1, NLRP3 e caspase-1 (figura 4A, 4B e 4C) encontra-se aumentada em monócitos de gestantes portadoras de PE, estimulados ou não com Hsp70, quando comparado com os grupos GN e MNG. Menor expressão desses genes foi observada em monócitos de GN, estimulados ou não com Hsp70, quando comparado com o grupo MNG. O estímulo com Hsp70 não alterou a expressão gênica de NLRP1, NLRP3 e caspase-1 nos três grupos estudados.

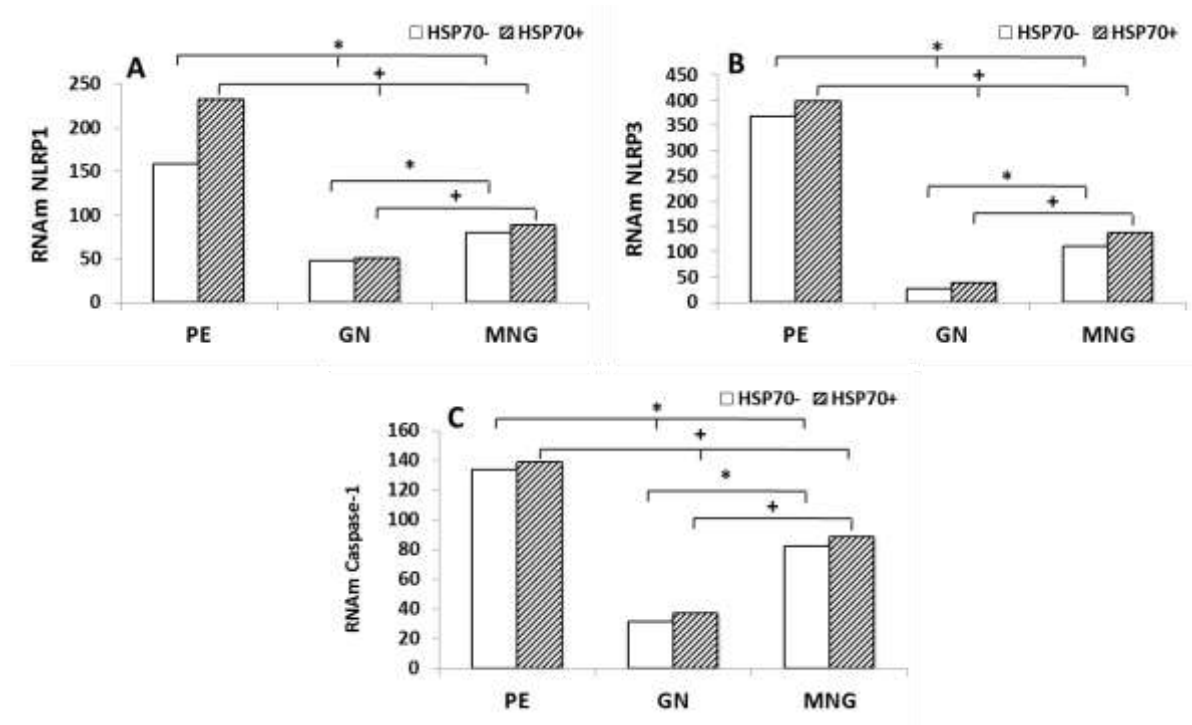


Figura 4: Expressão gênica de NLRP1 (A), NLRP3 (B) e caspase-1 (C) em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normotensas (GN) e mulheres não grávidas (MNG), estimulados ou não com Hsp70. * $p < 0,05$ entre os grupos Hsp70-; + $p < 0,05$ entre os grupos HSP70+; # $p < 0,05$ entre Hsp70- e Hsp70+ (teste de Kruskal-Wallis).

O aumento da expressão gênica da citocina IL-1 β (fig 5A) é observado em monócitos de gestantes portadoras de PE, estimulados ou não com Hsp70, quando comparado com os grupos GN e MNG. No entanto, o grupo GN apresenta diminuição na expressão do gene IL-1 β em monócitos estimulados ou não com Hsp70, quando comparado com o grupo MNG. A expressão gênica de IL-18 (fig 5B) e HMGB1 (fig 5C) tanto endógena como estimulada por Hsp70 em monócitos de gestantes portadoras de PE está aumentada em relação ao grupo GN. Menor expressão do gene HMGB1 foi detectada em monócitos de GN, estimulados com Hsp70 em comparação com o grupo MNG. O estímulo com Hsp70 não induziu aumento da expressão genica de IL-1 β , IL-18 e HMGB1 por monócitos dos três grupos estudados.

Na figura 5D observa-se aumento da expressão gênica de TNF- α em monócitos de gestantes com PE, estimulados ou não com Hsp70, quando comparados com os grupos de GN e MNG. Além disso, observa-se diferença significativa entre a expressão gênica de TNF- α em monócitos não estimulados (Hsp70-) e estimulados com Hsp70 (Hsp70+), em todos os grupos estudados.

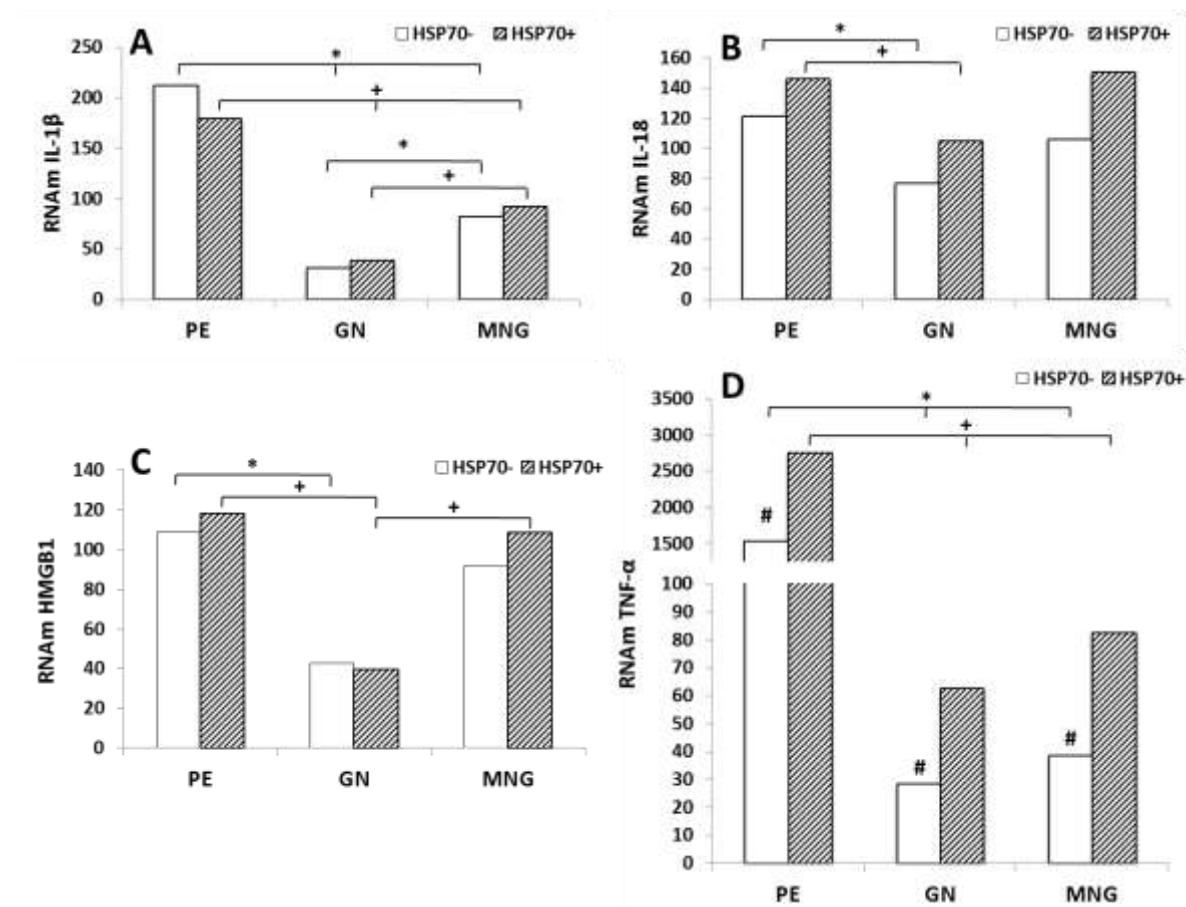


Figura 5: Expressão gênica de IL-1 β (A), IL-18 (B), HMGB1 (C) e TNF- α (D) em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normotensas (GN) e mulheres não grávidas (MNG), estimulados ou não com Hsp70. * $p < 0,05$ entre os grupos Hsp70-; + $p < 0,05$ entre os grupos Hsp70+; # $p < 0,05$ entre Hsp70- e Hsp70+ (teste de Kruskal-Wallis).

3.6. Produção de citocinas por monócitos estimulados ou não com Hsp70

Na figura 6A observa-se produção endógena de IL-1 β , produzida por monócitos de gestantes portadoras de PE significativamente mais elevada em relação aos grupos GN e MNG. O estímulo com Hsp70 induziu maior produção de IL-1 β pelas células de gestantes pré-eclâpticas apenas quando comparada ao grupo GN. Também é possível notar diminuição dos níveis da citocina em monócitos de GN estimulados com Hsp70 comparado com o grupo MNG. Além disso, observa-se diferença significativa entre a produção de IL-1 β por monócitos dos três grupos estudados, estimulados com Hsp70 (Hsp70+) e a produção basal dessas células (Hsp70-).

Observou-se aumento da produção de IL-18 por monócitos de gestantes com PE não estimulados com Hsp70, em relação ao grupo GN (Figura 6B). Nota-se

também diminuição nos níveis endógenos da citocina por monócitos de GN quando comparada com o grupo MNG. O estímulo com Hsp70 não induziu aumento da produção de IL-18 por monócitos dos grupos PE, GN e MNG.

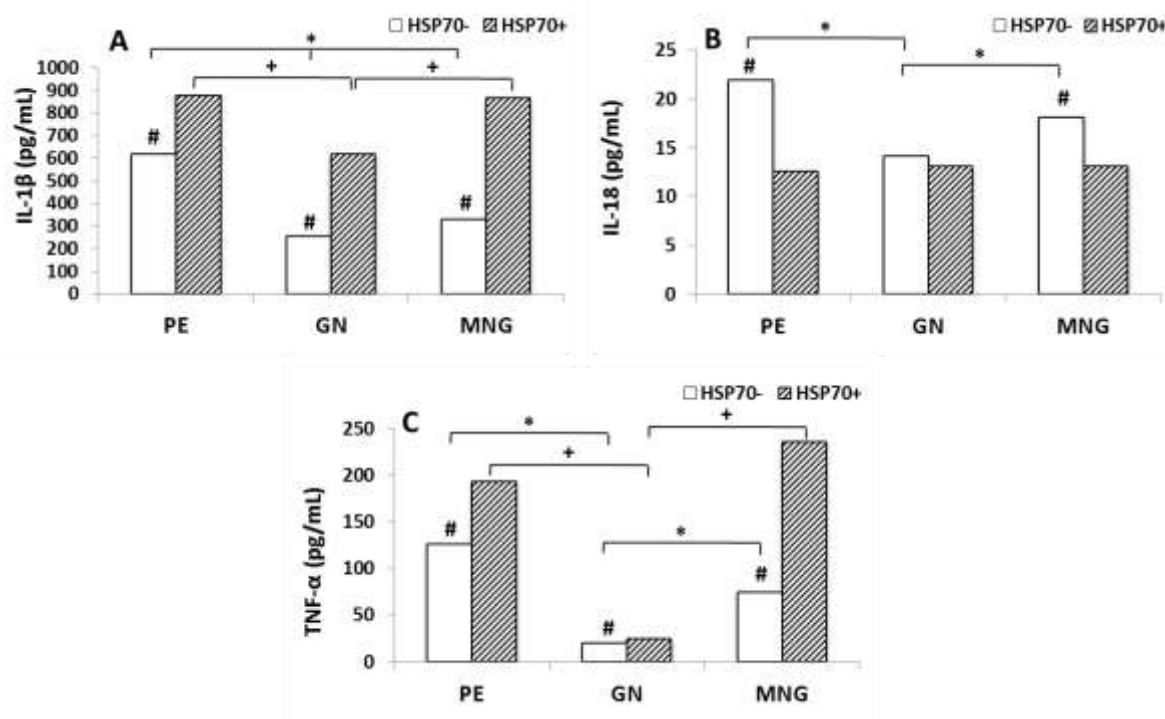


Figura 6: Produção de IL-1 β (A), IL-18 (B) e TNF- α (C) por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes normotensas (GN) e mulheres não grávidas (MNG), estimulados ou não com Hsp70. * $p < 0,05$ entre os grupos Hsp70-; + $p < 0,05$ entre os grupos Hsp70+; # $p < 0,05$ entre Hsp70- e Hsp70+ (teste de Kruskal-Wallis).

Na figura 6C observa-se maior concentração de TNF- α tanto endógena como estimulada com Hsp70 produzida por monócitos dos grupos PE e MNG em relação ao grupo GN. Além disso, monócitos de gestantes portadoras de PE, de normotensas e mulheres não grávidas estimulados com Hsp70 apresentaram maior produção de TNF- α em relação à produção basal por essas células.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a participação das DAMPs, HA, Hsp70 e HMGB1 na resposta inflamatória sistêmica observada na PE. As concentrações plasmáticas dessas DAMPs foram significativamente maiores em gestantes portadoras de PE quando comparadas com gestantes normotensas e mulheres não grávidas. Esses resultados confirmam estudos prévios da literatura (Berg et al., 2001; Naruse et al.,

2012; Peracoli et al., 2013; Romão et al., 2014; Zhu et al., 2015) evidenciando a presença de níveis sistêmicos elevados dessas DAMPs nas gestantes pré-eclâmpticas e sua participação na patogênese da PE. A origem dessas DAMPs, no plasma, não é conhecida, mas existem evidências de que podem ser liberadas a partir de tecidos lesados e células necróticas e incluem componentes de matriz extracelular degradados, proteínas de choque térmico, proteína HMGB1 e ácidos nucleicos, entre outros. Na PE, muitas dessas DAMPs são conhecidas por contribuir tanto para a inflamação placentária local como para a inflamação sistêmica e a disfunção endotelial. Considerando que na PE o sinciciotrofoblasto placentário é submetido a estresse oxidativo e inflamatório, moléculas inflamatórias como Hsp70, HMGB1, Galectin 3 e Syncytin 1 são transportadas por microvesículas e podem atuar como DAMPs tanto na placenta quanto nas células mononucleares do sangue periférico em gestantes com PE (Iversen, 2013). Assim, a liberação pela placenta de microvesículas e nanovesículas originadas do sinciciotrofoblasto para a circulação materna, pode exercer atividade pró-inflamatória, antiendotelial e pró-coagulante in vitro, características dessa síndrome materna (Sargent et al., 2003; Chen et al., 2016). Segundo Khan & Hay (2015) é possível que estas micropartículas possam atuar como DAMPs, induzindo hiperativação de inflamassoma e resultando no estado inflamatório exagerado na PE. Em trabalho recente demonstramos ativação do inflamassoma NLRP3 em placenta de gestantes pré-eclâmpticas, representada por aumento da expressão gênica de NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α e HMGB1 e níveis elevados de caspase-1 e dessas citocinas inflamatórias em homogenato placentário (Weel et al., 2016).

No presente estudo, a análise da expressão gênica de NLRP1 e NLRP3, de caspase-1, bem como de IL-1 β , IL-18, HMGB1 e TNF- α em monócitos do sangue periférico de gestantes portadoras de PE mostrou que esses parâmetros encontram-se elevados nessas gestantes e confirma resultados anteriores da ativação espontânea desses inflamassomas na PE (Matias et al., 2015). Esses resultados associados com aumento da expressão protéica das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e HMGB1 demonstram ativação endógena dessas células quando comparados com monócitos de gestantes normotensas. Assim, a ativação endógena de inflamassomas em monócitos circulantes de gestantes pré-eclâmpticas sugere que essas células podem ser ativadas por alarminas ou DAMPs presentes no

plasma. É descrito que esses complexos que promovem a inflamação podem ser ativados por moléculas derivadas do hospedeiro, demonstrando que nosso sistema imunológico não é apenas capaz de reconhecer partículas estranhas, mas também pode reagir a indicadores endógenos de dano celular tais como ATP extracelular, (Mariathasan et al., 2006) estresse metabólico (Schroder et al., 2010), hialurona, um dos principais componentes da matriz extracelular que é liberada durante lesão tecidual (Yamasaki et al., 2009), ácido úrico, reativos intermediários do oxigênio, entre outras DAMPs (Saïd-Sadier & Ojcius, 2012).

No presente estudo, o estímulo dos monócitos de gestantes pré-eclâmpticas com HA induziu aumento da expressão gênica de NLRP3 e caspase-1, confirmando os resultados de Yamazaki et al. (2009). No entanto, as células de gestantes portadoras de PE também apresentaram aumento da expressão gênica de NLRP1 quando estimuladas com HA. Essa ligação do HA no inflamassoma NLRP1 pode ser explicada devido a um polimorfismo de NLRP1 variante rs12150220 (L155H) encontrado em gestantes portadoras de PE (Pontillo et al., 2015).

A expressão gênica de IL-1 β , TNF- α e HMGB1 em monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e mulheres não-grávidas estimulados com HA mostrou-se aumentada quando comparada com gestantes normotensas. Esses resultados, em conjunto com a diminuição da expressão de caspase-1 e IL-1 β quando os monócitos foram cultivados com HA e glibenclamida, inibidor do inflamassoma (Lamkanfi et al., 2009) comprovam que HA exerce efeito estimulador sobre a atividade inflamatória dessas células por meio da ativação do inflamassoma. Os resultados da ativação dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas induzidos por HA são semelhantes aos obtidos previamente por estímulo com urato monossódico (Matias et al., 2015) e sugerem que as DAMPs, HA e ácido úrico, quando em concentrações elevadas no plasma, podem estar envolvidas no processo inflamatório sistêmico pela manutenção da ativação dos monócitos das gestantes com PE.

Em relação ao estímulo com Hsp70, este não foi capaz de aumentar significativamente a expressão de NLRP1, NLRP3 e caspase-1, sugerindo que essa DAMP não ativa os inflamassomas. Nossos resultados mostram que o estímulo de monócitos com Hsp70 induziu aumento da produção de IL-1 β e TNF- α , sugerindo que outra via de ativação possa estar envolvida, provavelmente a via do TLR4.

Mandrekar et al. (2008) demonstraram que a indução de estresse oxidativo leva à produção de Hsp70, que regula a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a expressão do gene do TNF- α em monócitos e macrófagos. De acordo com por Lee et al. (2013) Hsp70 recombinante humana induz a secreção de citocinas pro-inflamatórias via interação com o receptor TLR4. Segundo Netea et al. (2009; 2010) monócitos humanos do sangue periférico, diferentemente dos macrófagos teciduais, possuem a caspase-1 constitutivamente ativada sendo, portanto, capazes de clivar a pró-IL-1 β em IL-1 β biologicamente ativa somente com um sinal de ativação, como a interação de ligantes com os receptores TLR2 e TLR4. Assim, a produção de IL-1 β é diferentemente regulada em monócitos e macrófagos, refletindo as diferentes funções dessas células na defesa do hospedeiro e na inflamação e representando uma adaptação de cada célula ao seu respectivo ambiente.

A ativação dos inflamassomas geralmente requer dois sinais. O primeiro sinal consiste na ativação do receptor TLR resultando na produção de pró-IL-1 β e pró-IL-18, assim como no aumento da transcrição e tradução de moléculas como NLRP3. O segundo sinal está relacionado com a montagem e ativação do inflamassoma e pode ser ativado por uma variedade de estímulos (Martinon et al., 2006). Segundo Bauernfeind et al. (2009) a necessidade dessa dupla estimulação para ativar o inflamassoma poderia ser importante para impedir a ativação descontrolada de NLRP3, responsável por consequências devastadoras no hospedeiro, como ocorre em doenças auto-inflamatórias.

Os níveis elevados de TNF- α em gestantes pré-eclâmpicas poderiam atuar no complexo inflamassoma pelo seu efeito estimulador sobre o fator de transcrição nuclear- κ B. A síntese de TNF- α , bem como da IL-1 β é regulada, em parte, pelo NF- κ B, que está mais ativo em células de gestantes com PE (Giorgi et al, 2012). Esse fator regula a transcrição de genes relacionados à inflamação (Matsusaka et al, 1993; Striz et al, 2011) e o TNF- α , por sua vez, age estimulando a ativação de NF- κ B, mantendo um ciclo de ativação celular (Vallabhapurapu & Karin, 2009). Sendo assim, apesar de não estar diretamente relacionado com o inflamassoma, TNF- α é uma importante citocina inflamatória produzida no primeiro sinal de ativação desse complexo multiproteico. Estudo recente demonstrou que o estímulo *in vitro* com TNF- α induz, precocemente, a expressão de RNAm de NLRP3 em linhagem de adipócitos 3T3-L1 que é detectada logo após uma hora de cultivo, atingindo a

concentração máxima 3 h após a estimulação e sugerindo que o gene NLRP3 é um gene responsivo imediato ao TNF- α . A expressão de NLRP3 induzida por TNF- α nessas células depende da via ERK, provavelmente em coordenação com a via do NF- κ B (Furuoka et al., 2016). Além disso, de acordo com Bauernfeind et al. (2016), níveis sistêmicos elevados de TNF- α são responsáveis pelo aumento da expressão de NLRP3 e atividade de caspase-1 em tecidos adiposos e fígado em camundongos idosos, sugerindo que a via do inflamassoma NLRP3 tem importante papel nos processos inflamatórios estéreis.

Monócitos de gestantes normotensas estimulados com HA e Hsp70 apresentam menor expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-18, TNF- α e HMGB1 em relação ao grupo das gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas. Essa menor expressão observada nas gestantes normotensas poderia ser decorrente da regulação exercida por IL-10 nessas células. O predomínio da citocina anti-inflamatória IL-10 na gestação normal atua na minimização dos efeitos deletérios de uma resposta inflamatória excessiva, sendo capaz de regular a resposta inflamatória que ocorre na gestação pelo controle da expressão gênica de IL-1 β e TNF- α . Em trabalho anterior demonstrou-se que monócitos de gestantes pré-eclâmpticas produzem níveis endógenos de IL-10 significativamente menores do que gestantes normotensas, enquanto os valores de TNF- α encontram-se elevados (Cristofalo et al., 2013), corroborando com os achados da literatura (Azizieh et al., 2005).

Em conclusão, os resultados do presente trabalho mostram que monócitos de gestantes portadoras de PE apresentam ativação endógena dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e expressam níveis elevados de IL-1 β , IL-18, HMGB1 e TNF- α . A ativação desses inflamassomas associou-se à maior concentração plasmática de HA nessas gestantes. O estímulo de monócitos com HA induziu maior expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β e HMGB1, bem como a produção de IL-1 β foi mais evidente nos grupos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas. O estímulo de monócitos com Hsp70 contribuiu para produção de IL-1 β e TNF- α por essas células por meio de mecanismo independente de ativação dos inflamassomas. Esses resultados sugerem a participação dessas DAMPs na resposta inflamatória sistêmica, característica da PE. O estudo de mecanismos envolvidos na ativação de monócitos por DAMPs, dependentes ou não de inflamassomas, em gestantes

portadoras de PE permitirá melhor compreensão dessa importante síndrome inflamatória da gestação.

5. REFERÊNCIAS

- American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin no. 33. Washington, DC.: ACOG; 2002; 2:229–35.
- Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokines synthesis in human monocytes. *J Exp Med*. 2000; 192:565n-70.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002; 277:15028-34.
- Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 54:30-7.
- Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cuttingedge: NF-kappa B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 2009; 183:787-91.
- Bauernfeind F, Niepmann S, Knolle PA, Hornung V. Aging-Associated TNF Production Primes Inflammasome Activation and NLRP3-Related Metabolic Disturbances. *J Immunol*. 2016; 197:2900-8.
- Berg S, Engman A, Holmgren S, Lundahl T, Laurent TC. Increased plasma hyaluronan in severe pre-eclampsia and eclampsia. *Scand J Clin Lab Invest*. 2001; 61:131-7.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11:309-16.
- Bustin M. Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:5237-46.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Nastasi G, Calatroni A. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80:480-90.

- Chen Q, Yin YX, Wei J, Tong M, Shen F, Zhao M, et al. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) in the cytoplasm of placental syncytiotrophoblast from preeclamptic placentae. *Cytokine* 2016; 85: 30-6.
- 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.
- Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:707-35.
- Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis.* 2003; 187:S370-84.
- Dinarello CA. IL-18: A Th1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103:11-24.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:519-50.
- Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 2010; 464:1357-61.
- Eder C. Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology.* 2009; 214:543-53.
- Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 2009; 10:241-7.
- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997; 242:27-33.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004; 384:201-232.
- Furuoka M, Ozaki KI, Sadatomi D, Mamiya S, Yonezawa T, Tanimura S, Takeda K. TNF- α induces caspase-1 activation independently of simultaneously induced NLRP3 in 3T3-L1 cells. *J Cell Physiol.* 2016; 231:2761-7.
- Giorgi VS, Peraçoli MT, Peraçoli 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.
- Grishman EK, White PC, Savani RC. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 β in the development and progression of type 1 diabetes. *Pediatr Res.* 2012; 71(6):626-32.

- Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 1991; 66: 191-7.
- Holmlund U, Wähämaa H, Bachmayer N, Bremme K, Sverremark-Ekström E, Palmblad K. The novel inflammatory cytokine high mobility group box protein 1 (HMGB1) is expressed by human term placenta. *Immunology*. 2007; 122:430-7.
- Iversen A. Inflammatory mechanisms in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2013; 3:58.
- 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.
- Khan RN, Hay DP. A clear and present danger: inflammasomes DAMPING down disorders of pregnancy. *Hum Reprod Update* 2015; 21:388-405.
- 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.
- Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res*. 2011; 4:39-49.
- Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci*. 2008; 15:231-42.
- Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*. 2005; 11:653-60.
- Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol*. 2009; 187:61–70.
- Lamkanfi M¹, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, Wewers MD, Tracey KJ, Kanneganti TD, Dixit VM. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol*. 2010; 185:4385-92.
- Larionov, A., Krause, A., Miller, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinform*. 2005; 6: 62.
- Lee KH¹, Jeong J, Yoo CG. Positive feedback regulation of heat shock protein 70 (Hsp70) is mediated through Toll-like receptor 4-PI3K/Akt-glycogen synthase kinase-3 β pathway. *Exp Cell Res*. 2013; 319:88-95.
- 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.

- Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol*. 2006; 118:268-75.
- Mandrekar P, Catalano D, Jeliaskova V, Kodys K. Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for TNF- α regulation. *J Leukoc Biol*. 2008; 84:1335-45.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 2006; 440:228–32
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006; 440:237–41.
- 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.
- Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF- κ B and NF-IL6 synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin-6 and interleukin-8. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:10193-7.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296:301-5.
- Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstetter 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.
- Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Preeclampsia. *Lancet*. 2016; 387:999-1011.
- Naruse K, Sado T, Noguchi T, Tsunemi T, Yoshida S, Akasaka J, Koike N, Oi H, Kobayashi H. Peripheral RAGE (receptor for advanced glycation endproducts)-ligands in normal pregnancy and preeclampsia: novel markers of inflammatory response. *J Reprod Immunol*. 2012; 93:69-74.
- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183:S1-S22.
- Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA. Differential requirement for the

activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009; 113:2324-35.

Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog*. 2010; 6:e1000661.

Njemini R, Lambert M, Demanet C, Mets T. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Immunol*. 2003; 58:664-9.

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

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

Peracoli JC, Rudge MVC, Peracoli MTS. Tumor necrosis factor- α in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 57:177-85.

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

Peraçoli MT, Bannwart CF, Cristofalo R, Borges VT, 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 JC¹, 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.

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

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

Pontillo A, Reis EC, Bricher PN, Vianna P, Diniz S, Fernandes KS, Chies JA, Sandrim V. NLRP1 L155H Polymorphism is a Risk Factor for Preeclampsia Development. *Am J Reprod Immunol*. 2015; 73:577-81.

- Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013; 22:8-19.
- 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.
- Romão M, Weel IC, Lifshitz SJ, Peraçoli MT, Witkin SS. Elevated hyaluronan and extracellular matrix metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2014; 289:575-9.
- Saïd-Sadier N, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J.* 2012; 35:437-49.
- Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S, Redman CW. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol.* 2013; 59:153-60.
- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol.* 2006; 177:1272-81.
- Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: A sensor for metabolic danger? *Science.* 2010; 327:296–300.
- Schuiling GA, Koiter TR, Faas MM. Why pre-eclampsia? *Hum Reprod.* 1997; 12:2087-91.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol.* 2006; 85:699-715.
- Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Liu XD, Brabcova I, Sekerkova A, Poole JA, Jaresova M, Slavcev A, Rennard SI. Epithelial cells modulate genes associated with NF kappa B activation in co-cultured human macrophages. *Immunobiology.* 2011; 216:1110-6.
- Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012; 481(7381): 278-86.
- Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem.* 2004; 279:17079-84.
- 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.

- Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:693-733.
- van Rijn BB, Franx A, Steegers EA, de Groot CJ, Bertina RM, Pasterkamp G, Voorbij HA, Bruinse HW, Roest M. Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS One*. 2008; 3:e1865.
- Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med*. 2004; 255:320-31.
- Weel IC, Romão-Veiga M, Matias ML, Fioratti EV, Peraçoli JC, Borges VT, Araujo Jr JP, Peraçoli MT. Inflammasome activation in placenta from pregnant women with preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2016 (submitted).
- Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Misaghi A, Hoffman HM, Gallo RL. NLRP3/Cryopyrin Is Necessary for Interleukin-1 β (IL-1 β) Release in Response to Hyaluronan, an Endogenous Trigger of Inflammation in Response to Injury. *J Biol Chem*. 2009; 284:12762–71.
- Yang CS, Shin DM, Jo EK. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *Int Neurourol J*. 2012; 16:2-12.
- Zhu L, Zhang Z, Zhang L, Shi Y, Qi J, Chang A, Gao J, Feng Y, Yang X. HMGB1-RAGE signaling pathway in severe preeclampsia. *Placenta*. 2015; 36:1148-52.



CAPÍTULO III

DAMPs induzem polarização da imunidade adaptativa para perfil inflamatório em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Mariana Romão-Veiga¹; Vanessa Rocha Ribeiro²; Graziela Gorete Romagnoli¹; Mariana Leticia Matias²; Priscila Rezeck Nunes²; Vera Therezinha Medeiros Borges²; José Carlos Peraçoli²; Maria Terezinha Serrão Peraçoli¹

¹ Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, SP, Brasil.

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, SP, Brasil.

RESUMO

A pré-eclampsia (PE) se caracteriza por ativação anormal do sistema imune inato e adaptativo. No plasma dessas gestantes moléculas denominadas padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) tais como, proteína de choque térmico (Hsp70), Hialurona (HA) e Ácido Úrico podem contribuir diretamente com a patogênese dessa doença. Essas DAMPs podem ativar o inflamassoma, resultando na liberação de IL-1 β e IL-18, citocinas que auxiliam a ativação de células T em Th17 e Th1, respectivamente. O presente projeto teve por objetivo avaliar o perfil endógeno das subpopulações de células T (Th1, Th2, Treg e Th17) através da análise dos fatores de transcrição e o padrão de citocinas produzidas por essas células estimuladas com as DAMPs (Hsp70, hialurona e urato monossódico). Foram estudadas 20 gestantes portadoras de PE, 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres saudáveis não-grávidas (MNG). Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas para avaliação da expressão endógena dos fatores de transcrição para células T-bet (Th1), GATA3 (Th2), RORc (Th17) e Foxp3 (Treg) por citometria de fluxo. Essas células foram cultivadas na ausência ou presença das DAMPs e o sobrenadante foi empregado para determinação das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ e TNF- β), Th2 (IL-4), Treg (IL-10 e TGF- β 1) e Th17 (IL-17 e IL-22) por ELISA. Os resultados mostraram polarização para perfis inflamatórios Th1/Th17 e diminuição de perfis anti-inflamatórios Th2/Treg em gestantes portadoras de PE associados a níveis endógenos elevados das citocinas inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-17 e diminuídos de TGF- β e IL-10 quando comparadas com gestantes normotensas. O estímulo das células com MSU induziu aumento de IFN- γ , IL-22 em todos os grupos estudados, enquanto os estímulos com MSU e HA induziram aumento de IL-17 somente no grupo de normotensas. As DAMPs MSU e Hsp70 induziram aumento significativo da produção de TNF- α nos grupos de PE e MNG. Níveis significativamente elevados de TGF- β 1 foram produzidos por células gestantes portadoras de PE estimuladas com MSU, HA e Hsp70, enquanto HA e Hsp70 induziram diminuição da produção dessa citocina em gestantes normotensas. A ativação endógena para perfil Th1/Th17 e expressão elevada de citocinas inflamatórias em gestantes pré-eclâpticas demonstram o desbalanço inflamatório presente nessas gestantes. O estímulo com as DAMPs foi capaz de estimular a resposta inflamatória em gestantes pré-eclâpticas sugerindo que essas alarminas

desempenham papel na ativação do sistema imune adaptativo e na liberação de citocinas inflamatórias participando na patogênese dessa importante síndrome da gestação.

1. INTRODUÇÃO

A principal causa de morbidade e mortalidade em 2 a 10% das gestações (ACOG, 2002), é a pré-eclâmpsia (PE), uma síndrome específica da gravidez. Essa síndrome é identificada pelos parâmetros clínicos: hipertensão arterial (PA $\geq$ 140 x 90 mmHg) e proteinúria ($\geq$ 300 mg/24h) (NHBPEP, 2000) a partir da vigésima semana de gestação ou até 120 dias após o parto. Outras complicações maternas também podem ser relacionadas à PE, como insuficiência renal, complicações neurológicas ou hematológicas, envolvimento hepático ou restrição de crescimento fetal (Tranquilli et al., 2014; Mol et al., 2016).

Na PE ocorre uma reação inflamatória sistêmica exacerbada caracterizada por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Johnson et al., 2002; Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007) e por alterações na produção de citocinas reguladoras, como interleucina-10 (IL-10) e fator transformador do crescimento beta (TGF- β) (Peraçoli et al., 2008; Raghupathy, 2013). A resposta inflamatória sistêmica intensa na PE parece estar relacionada com a liberação de substâncias capazes de induzir a inflamação e que são denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMP). As DAMPs são representadas por moléculas como ácido úrico (Matias et al., 2015), reativos intermediários do oxigênio, proteínas de choque térmico (HSPs) (Asea et al., 2002; Mandrekar et al., 2008) e produtos liberados da matriz extracelular, como fibronectina e hialurona (Okamura et al., 2001; Campo et al., 2010).

É por meio da interação com receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), expressos em células da imunidade inata, que as DAMPs exercem seu efeito inflamatório. Os principais são os receptores semelhantes ao *Toll* (TLRs), que reconhecem e ligam moléculas presentes na superfície de patógenos (Koga & Mor, 2008), além de produtos endógenos de células do hospedeiro, que são liberados durante lesão tecidual e denominados “alarminas” ou DAMPs (Matzinger, 2002; Kim et al., 2005). Outros receptores PRRs compreendem os membros da família de receptores Nod-like ou NLR (proteína contendo domínio de oligomerização

nucleotídica), que são proteínas citosólicas que reconhecem PAMPs e DAMPs no citoplasma da célula do hospedeiro, formando complexos denominados inflamassomas, como o NLRP3, que geram formas ativas de IL-1 β (Franchi et al., 2009). Em trabalhos recentes de nosso laboratório, foi demonstrado que as DAMPs urato monossódico (MSU) e hialurona (HA) são capazes de ativar o inflamassoma NLRP3, resultando no aumento da produção de IL-1 β por monócitos de gestantes portadoras de PE, enquanto a Hsp70, apesar de não estimular o inflamassoma, é capaz de aumentar a produção de IL-1 β por monócitos de gestantes portadoras de PE (Matias et al., 2015; Romao-Veiga et al., 2017).

Além da ativação da imunidade inata na PE, tem sido observada a produção predominante de citocinas de perfil Th1, como IL-2, IL-6, interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-12 (Saito et al., 1999; Darmochwal-Kolarz et al., 2002; Saito & Sakai, 2003; Tosun et al., 2010). Durante os estágios iniciais da gestação, é observado um balanço entre as células do tipo Th1/Th2, resultando no desenvolvimento da tolerância materna. Células T naïve com fenótipo CD4⁺ podem se diferenciar em células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias (Treg), dependendo do estímulo a que estão sujeitas (Saito et al., 2007a; Saito, 2010).

As citocinas IL-1 β e IL-18, liberadas após ativação do inflamassoma pelas DAMPs, são potentes mediadores inflamatórios e importantes na ativação da resposta imune adaptativa, sendo importantes na polarização de células T em Th17 e Th1, respectivamente (Conforti-Andreoni et al., 2011; Lasigliè et al., 2011; Liu et al., 2013; Land, 2015). Já as células Th₂ se diferenciam na presença de IL-4, enquanto as células T reguladoras, importantes na manutenção da auto-tolerância e na regulação da inflamação, desempenham importante papel na manutenção da gestação e são diferenciadas na presença de TGF- β (Saito et al, 2007b; Saito et al, 2010). A diferenciação de células T está relacionada também com fatores de transcrição. Células Th1, Th2, Th17 e Treg têm sua diferenciação regulada pelos fatores de transcrição T-bet (*T box transcription factor*), GATA3 (*GATA binding protein 3*), RORc (*retinoic acid-related orphan receptor C*) e Foxp3 (*forkhead box P3*), respectivamente (Jianjun et al, 2010). Estudos recentes mostram que as células Th1, Th17 e Treg estão relacionadas e possuem plasticidade podendo se converter umas nas outras (Peck & Mellins, 2010; Saito et al, 2010).

A literatura mostra que na PE existe ativação de resposta imune mediada por células T, caracterizada pela produção de citocinas de perfil Th1 como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , tanto no sangue periférico como na interface materno-fetal (Saito & Sakai, 2003). Esses linfócitos T estão ativados e relacionados ao mecanismo inadequado de tolerância materna, presente nessa patologia. Portanto, na PE o perfil predominante Th1 induz ativação de macrófagos, de reações citotóxicas e inflamatórias em detrimento do perfil Th2, relacionado à secreção de citocinas com atividade anti-inflamatória e reguladora como IL-10 e fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e que caracterizam o perfil imunológico da gestação normal (Saito et al., 2010).

A subpopulação de linfócitos CD4⁺ denominada Th17, por sua capacidade de produção de IL-17, foi descrita por participar de um fenótipo predominante Th1/Th17 sobre Th2/Treg em condições inflamatórias crônicas. O aumento dessa subpopulação pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de doenças autoimunes ou reações de rejeição de enxertos (Darmochwal-Kolarz et al., 2012). Santner-Nanan *et al.* (2009), relataram diminuição das células T reguladoras e um aumento das células do tipo Th17 no sangue periférico de mulheres com pré-eclâmpsia quando comparadas com grávidas normais. Já Darmochwal-Kolarz et al, (2012) demonstraram que células Th17 estão aumentadas no sangue periférico de gestantes com PE, enquanto tanto o número, quanto a função de células Treg estão diminuídos, podendo esse desbalanço ser responsável pela ativação da resposta inflamatória nessa patologia.

Células Treg (CD4⁺CD25⁺) têm papel importante no desenvolvimento e manutenção da tolerância em tecidos periféricos (Kuniyasu et al., 2000; Baecher-Allan et al., 2001) e expressam níveis elevados de CD25, antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) e o fator de transcrição FoxP3 (Sakaguchi et al, 2001; Fontenot et al., 2003; Waldmann et al., 2004). Segundo alguns autores a população de células Treg no sangue periférico de gestantes com PE está diminuída (Sasaki et al., 2007; Darmochwal-Kolarz et al., 2007; Santner-Nanan et al., 2009), enquanto outros referem números similares dessas células em gestantes normotensas e pré-eclâmpicas (Paeschke et al., 2005; Hu et al., 2008).

Os dados da literatura demonstram que na PE ocorre resposta inflamatória exacerbada, representada pela ativação de células da imunidade inata. Essa

ativação resulta na produção de citocinas inflamatórias que ativam células da imunidade adaptativa, levando ao aumento da inflamação. Esse trabalho teve como objetivo a determinação da expressão endógena das subpopulações de células T em gestantes portadoras de PE e análise do perfil de citocinas produzido por essas células, antes ou após estímulo com as DAMPs, urato monossódico (MSU), hialurona (HA) e Hsp70.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1. Casuística

Foram estudadas 20 gestantes portadoras de PE (grupo de estudo) e 20 gestantes normotensas (grupo controle) que realizaram assistência na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Também foram incluídas no estudo 20 mulheres saudáveis, não-grávidas, doadoras voluntárias do Banco de Sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

As gestantes foram consideradas portadoras de PE quando, sem antecedente, 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, enquanto as gestantes com idade menor que 18 anos o termo foi assinado também por seus pais ou responsáveis. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo nº 349.847).

2.2. Colheita de sangue

Foram coletados 10 mL de sangue por punção venosa para avaliação da expressão gênica e produção de citocinas por monócitos de gestantes portadoras de PE no momento do diagnóstico da doença e de gestantes normotensas no momento em que foram pareadas com as gestantes com PE. O sangue das mulheres não-grávidas foi obtido durante doação de sangue.

2.3. Isolamento e cultura de células mononucleares do sangue periférico

Após centrifugação para separação do plasma, as células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), segundo técnica previamente descrita (Peracoli et al., 2011). O anel rico em células mononucleares foi lavado duas vezes com meio de cultura RPMI 1640/HEPES (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) por 10 min a 1500 rpm. Após esse procedimento, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640/HEPES (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco BRL Life Technologies, Breda, The Netherlands). Para identificação das células, 50 µL da suspensão de células mononucleares foram incubados por 10 min a 37°C com 450 µL da solução de vermelho neutro a 0,02%. A concentração celular foi ajustada para 1×10^6 células/mL.

2.3.1. Obtenção de sobrenadante: As células foram distribuídas em placas de cultura de 24 orifícios (Falcon, Corning Incorporated- Life Sciences, Durham, EUA) em concentração de 1×10^6 células viáveis/mL e incubadas por 72 h a 37°C, em tensão de 5% de CO₂.

2.3.2. Citometria de fluxo: As células foram distribuídas em placas de cultura de 24 orifícios (Falcon) e incubadas por 90 min a 37°C, em tensão de 5% de CO₂. As células não-aderentes à placa foram obtidas por meio de lavagem dos orifícios da placa com meio de cultura RPMI 1640/HEPES (LGC Biotecnologia), sendo a viabilidade estimada por exclusão de coloração com azul Trypan 0,2 %. A concentração celular foi ajustada para 2×10^5 células viáveis/mL para a caracterização das subpopulações de células T.

2.4. Obtenção de sobrenadante de cultura de PBMCs

As células obtidas conforme descrito no item 2.3., foram incubadas a 37°C, em tensão de 5% de CO₂ por 72h, na ausência ou presença de 2,5 ng/mL Hsp70 (Sigma), 50 µg/mL de MSU (Sigma) ou 100 µg/mL Hialurona (R&D Systems). O sobrenadante obtido após 72h de cultivo foi aspirado, centrifugado e distribuído em alíquotas, que foram conservadas a -80°C até o momento da dosagem pela técnica de ELISA.

2.5. Análise da expressão dos fatores de transcrição em linfócitos T pela técnica de citometria de fluxo

A expressão dos fatores de transcrição intracitoplasmáticos para células Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3), Th17 (RORc) e Treg (FoxP3) foi avaliada após colheita do sangue (expressão endógena). A concentração celular foi ajustada para 2×10^5 células/mL, conforme descrito no item 2.3 e as células distribuídas em tubos Falcon para citômetro (BD Biosciences). As células foram incubadas com anticorpos BD Biosciences, com os respectivos fluorocromos: anti-CD3 (PE-Cy7), anti-CD4 (APC), anti-CD25 (APC-H7) e anti-CD127 (BB515) por 30 min, no escuro. Após centrifugação as células foram lavadas com *Wash Buffer* (BD Biosciences) e centrifugadas novamente por 5 min a 400g. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando *Perm Buffer* (BD Biosciences) para incubação com anticorpos BD Biosciences, marcados com fluorocromos específicos contra as proteínas intracelulares T-bet (PerCP-Cy5.5), GATA-3 (PE), RORc (PE) e FoxP3 (PE) por 30 min, no escuro e em temperatura ambiente. Para a delimitação dos gates, tubos controles foram incubados com anticorpos isotípicos específicos para cada fluorocromo (PE-Cy7, APC, APC-H7, BB515, PerCP-Cy5.5 e PE) em cada teste realizado. A análise de subpopulações Th1, Th2 e Th17 foi realizada dentro de gate para $CD3^+/CD4^+$, enquanto para análise de Treg foi realizado gate $CD3^+/CD4^+/CD25^+/CD127^{low}$. As amostras foram adquiridas num total de 30000 eventos em citômetro de fluxo *FACSCanto™* II (BD Biosciences) com software *FACSDIVA* (BD Biosciences). Os resultados foram analisados no *software FlowJo*, versão vX.10.6 (FlowJo, LLC).

2.6. Determinação das citocinas pela técnica de ELISA

Para quantificação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-22, IL-17, IL-10, IL-4 e TGF- β nos sobrenadantes de cultura de PBMC, tratados ou não com MSU, hialurona (HA) e/ou Hsp70, foram empregados kits comerciais específicos obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonais e policlonais, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas-padrão, foram recomendadas pelo fabricante. Limite de sensibilidade dos kits 15,6 pg/mL de TNF- α , 8 para IFN- γ , 5,8 para IL-22, 15 para IL-17, 3,9 para IL-10, 10 para IL-4 e 1,7 para TGF- β .

2.7. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados empregando-se testes paramétricos ou não-paramétricos, segundo o programa estatístico PRISM, (Graph Prism for Windows, version 6.01, GraphPad, CA, EUA). A comparação das características clínicas entre as gestantes foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn. A análise das subpopulações de células T CD4⁺ e das citocinas presentes no plasma foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Características clínicas dos grupos estudados

A análise das características clínicas das gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não grávidas (Tabela 1) mostrou não haver diferença estatística entre a idade materna nos grupos avaliados. Da mesma forma, não houve diferença significativa entre as gestantes portadoras de PE e normotensas, com relação à idade gestacional. Os valores da pressão arterial sistólica e diastólica foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nas gestantes portadoras de PE em relação às gestantes normotensas e mulheres não grávidas. Adicionalmente, os valores de proteinúria e de ácido úrico, hialurona e Hsp70 foram significativamente mais elevados ($p < 0,05$) no grupo de gestantes com PE em comparação com o grupo de gestantes normotensas e mulheres não-grávidas.

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais.

Características	Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (n = 20)	Gestantes normotensas (n = 20)	Mulheres não grávidas (n = 20)
Idade (anos)	25 (16 – 40)	26 (17 – 39)	27 (21 – 40)
Idade gestacional (semanas)	34 (27 – 40)	35 (27 – 39)	–
Pressão arterial sistólica (mmHg)	160 [#] (140 – 200)	110 (90 – 112)	116 (100 – 120)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	110 [#] (90 – 120)	69 (63 – 70)	75 (65 – 80)
Proteinúria (mg / 24h)	1510* (300 – 19800)	< 300	ND
Ácido úrico (mg/dL)	6,1 [#] (4,5 – 10,1)	3,8 (2,2 – 4,6)	4,2 (2,8 – 4,8)
Hialurona (ng/mL)	135,5 [#] (20,4 – 296,8)	62,4 (2,5 – 199,7)	42,8 (3,3 – 165,0)
Hsp70 (pg/mL)	907,1 [#] (404,63 – 1272,8)	680,23 (7,5 – 1090,4)	655,43 (12,7 – 1083,4)

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

3.2. Expressão de fatores de transcrição em subpopulações de linfócitos pela técnica de citometria de fluxo

Na figura 1 podem-se observar duas análises de subpopulações de perfis inflamatórios (Th1 e Th17), a percentagem de linfócitos expressando os respectivos fatores de transcrição e a Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) das proteínas intracelulares estudadas entre os grupos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), de gestantes normotensas (GN) e de mulheres não-grávidas (MNG). A análise dos perfis inflamatórios mostra que no perfil Th1, a percentagem de células expressando o fator de transcrição T-bet (figura 1A) é significativamente menor em gestantes normotensas quando comparadas aos outros grupos estudados. Já a MIF (figura 1B) encontra-se significativamente maior no grupo PE quando comparadas com os grupos GN e MNG. A expressão de RORc (perfil Th17) mostra também que a inflamação é predominante na PE, através do aumento significativo da percentagem de células expressando tal fator (figura 1C) e da MIF (figura 1D) nas pacientes com PE quando comparadas com os grupos GN e MNG.

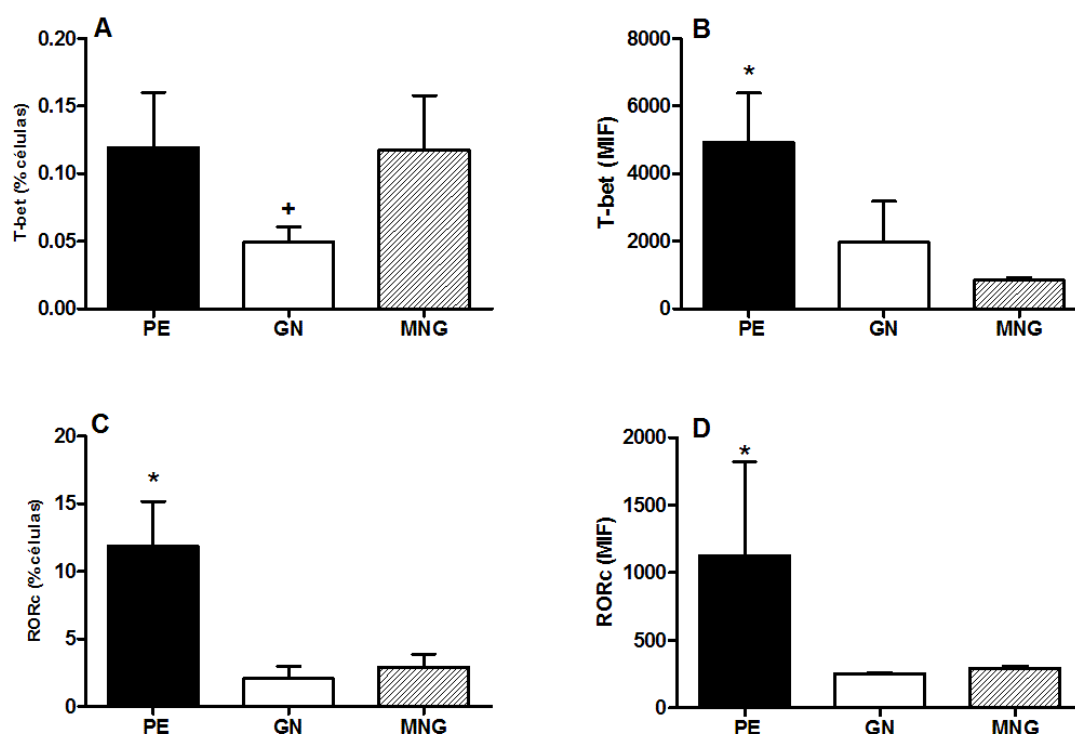


Figura 1. Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de intensidade de fluorescência (MIF) em 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres não-grávidas (MNG). **(A)** % de linfócitos expressando T-bet; **(B)** MIF de linfócitos expressando T-bet; **(C)** % de linfócitos expressando RORc; **(D)** MIF de linfócitos expressando RORc. Resultados expressos em média $\pm$ SD. * $p < 0,05$ vs. GN e MNG; + $p < 0,05$ vs. PE e MNG (ANOVA).

Na figura 2 observam-se duas análises de subpopulações de perfis anti-inflamatórios (Th2 e Treg), a percentagem de linfócitos expressando os respectivos fatores de transcrição e a Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) das proteínas intracelulares estudadas entre os grupos de gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não-grávidas.

A análise do perfil anti-inflamatório Th2 mostra que a percentagem de linfócitos expressando GATA-3 (figura 2A) foi significativamente menor nos grupos PE e MNG em relação a GN, enquanto a MIF (figura 2B) apresentou aumento significativo no grupo PE ao ser comparado com o grupo GN. No perfil Treg, também se observa uma significativa diminuição da percentagem de linfócitos expressando FoxP3 nos grupos PE e MNG em relação ao grupo de GN, não havendo diferença significativa da MIF entre os grupos.

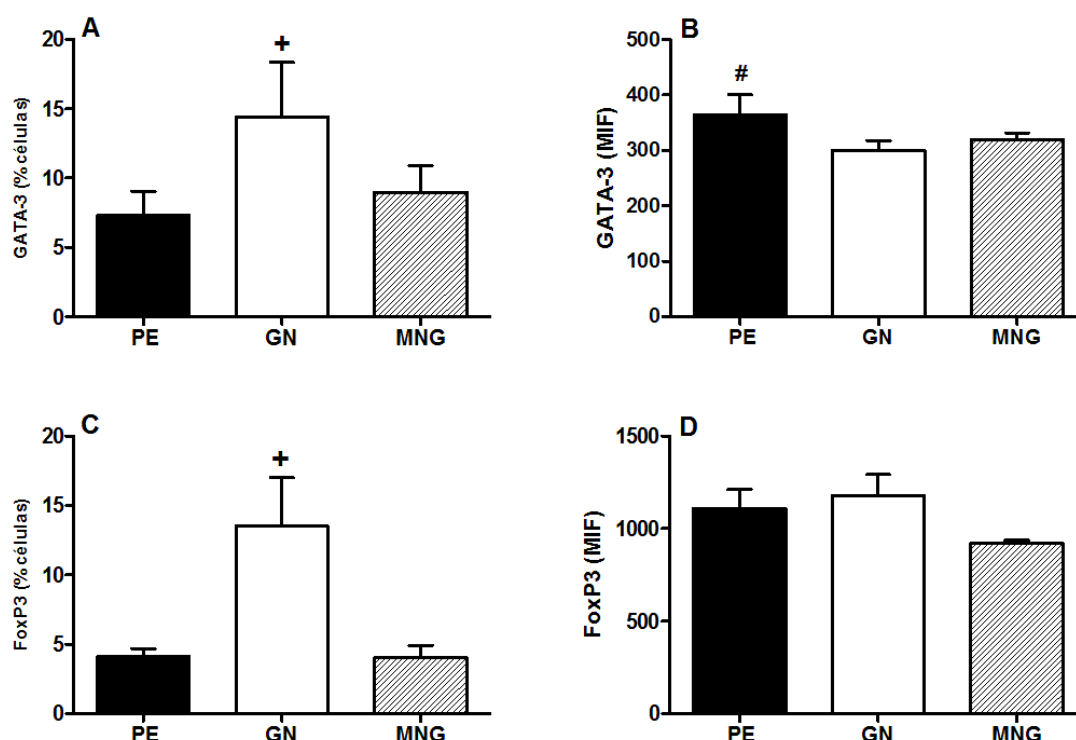


Figura 2. Percentagem de linfócitos expressando fator de transcrição intracelular e Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) em 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres não-grávidas (MNG). **(A)** % de linfócitos expressando GATA-3; **(B)** MIF de linfócitos expressando GATA-3; **(C)** % de linfócitos expressando FoxP3; **(D)** MIF de linfócitos expressando FoxP3. Resultados expressos em média $\pm$ SD. # $p < 0,05$ vs. GN; + $p < 0,05$ vs. PE e MNG (ANOVA).

3.3. Produção de citocinas por PBMCs de gestantes e mulheres não-grávidas

3.3.1. Estímulo com urato monossódico (MSU)

Na figura 3 observa-se concentração endógena e induzida por MSU das citocinas inflamatórias TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C) e IL-22 (D) produzidas por PBMCs de gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não-grávidas, cultivadas por 72h.

A produção de TNF- α (figura 3A) por essas células foi maior nos grupos PE e MNG quando comparados com GN, tanto na produção endógena quanto na estimulada com MSU. Além disso, o estímulo com MSU induziu aumento da produção de TNF- α nos grupos PE e MNG. Em relação à citocina IFN- γ (figura 3B), a concentração foi maior em sobrenadante não estimulado de gestantes com PE comparado somente com o grupo GN. No entanto, o estímulo com MSU induziu uma

maior produção de IFN- γ em todos os grupos estudados. A citocina IL-17 (figura 3C) apresentou aumento endógeno em gestantes com PE quando comparada com gestantes normotensas, entretanto o estímulo com MSU somente aumentou a produção da citocina no grupo GN. Já a produção endógena de IL-22 (figura 3D) foi similar em todos os grupos estudados, porém o MSU estimulou o aumento na produção da citocina em todos os grupos estudados.

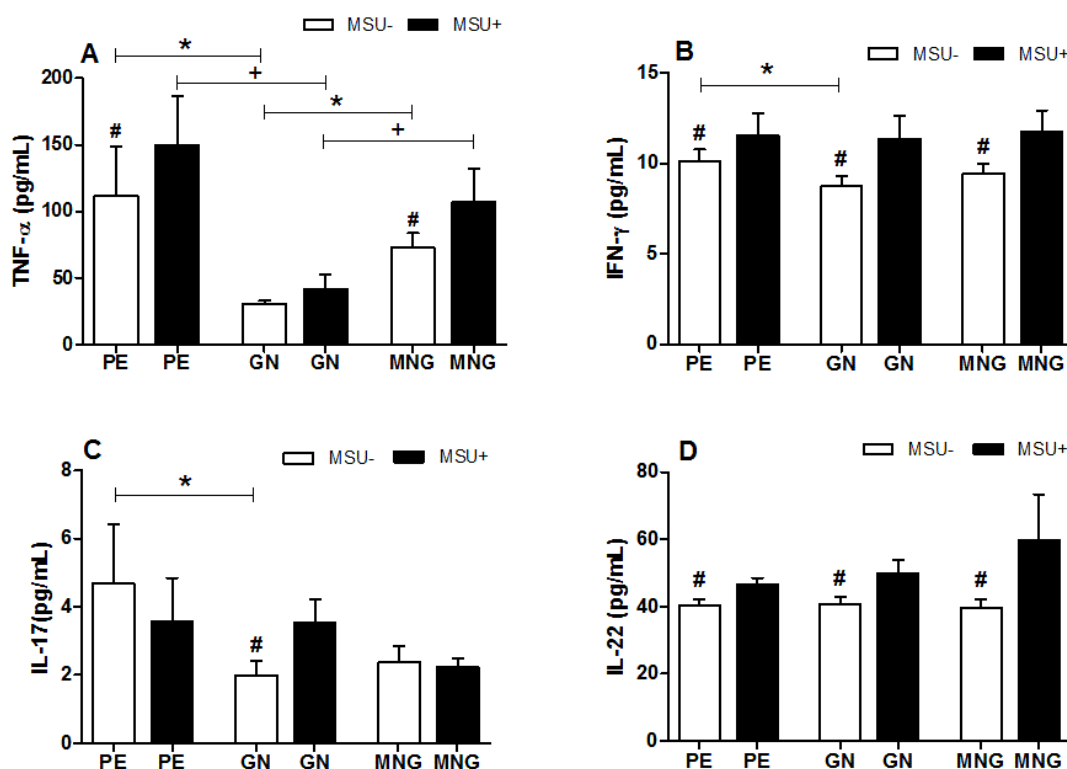


Figura 3. Produção TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C) e IL-22 (D) por células mononucleares de 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres não-grávidas (MNG), não estimuladas (MSU-) e estimuladas com urato monossódico (MSU+). Resultados expressos em média $\pm$ SD. # $p < 0,05$ entre grupos MSU- e MSU+; * $p < 0,05$ entre grupos MSU-; + $p < 0,05$ entre grupos MSU+ (ANOVA).

Na figura 4 esta demonstrada a concentração endógena e induzida por MSU das citocinas anti-inflamatórias, IL-10 (A), IL-4 (B) e TGF- β 1 (C) produzidas por PBMCs de gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não-grávidas, cultivadas por 72h.

A citocina IL-10 (figura 4A) apresentou níveis diminuídos em gestantes com PE quando comparada aos outros grupos, tanto na produção endógena como na estimulada por MSU. Não foi observada diferença significativa entre os grupos

estudados na produção de IL-4 (figura 4B). Em relação à produção endógena de TGF- β 1 (figura 4C), foram encontrados níveis diminuídos em gestantes com PE quando comparada aos outros grupos estudados e, ao contrário dos grupos GN e MNG, as gestantes com PE apresentaram aumento de TGF- β 1 quando estimuladas com MSU.

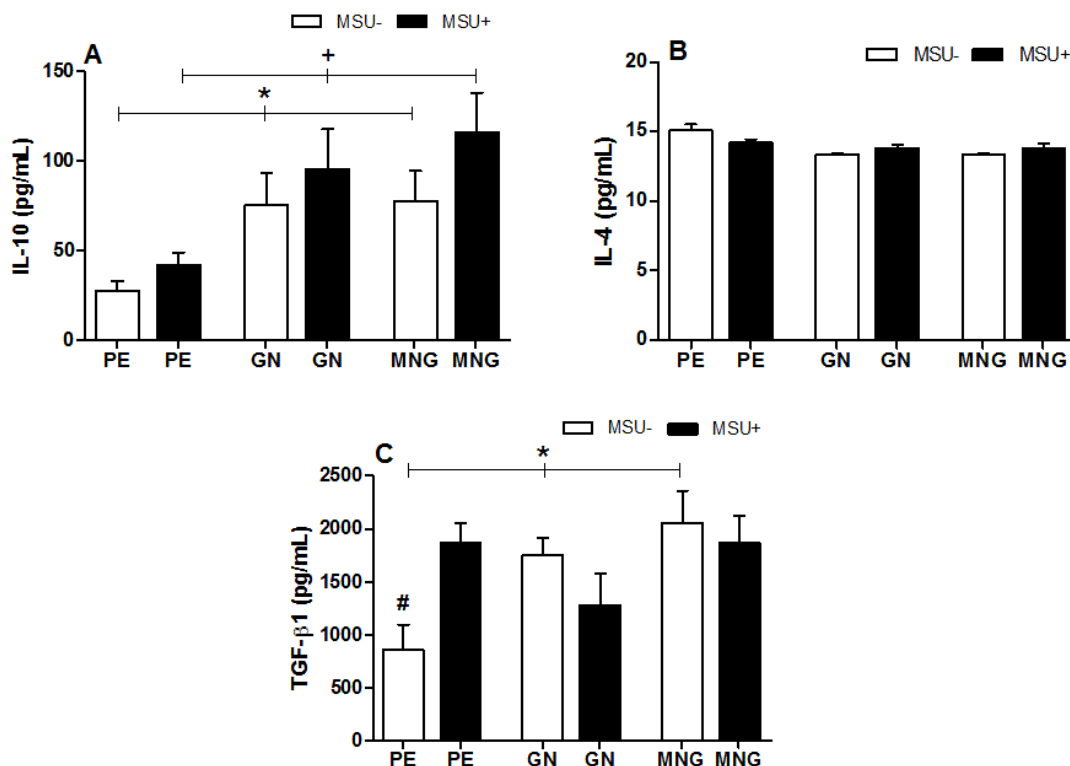


Figura 4. Produção de IL-10 (A), IL-4 (B) e TGF- β 1 (C) por células mononucleares de 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres não grávidas (MNG), não estimuladas (MSU-) e estimuladas com urato monossódico (MSU+). Resultados expressos em média $\pm$ SD. # $p < 0,05$ entre grupos MSU- e MSU+; * $p < 0,05$ entre grupos MSU-; + $p < 0,05$ entre grupos MSU+ (ANOVA).

3.3.2. Estímulo com Hialurona (HA)

Observa-se na figura 5A concentração endógena e induzida por hialurona (HA) das citocinas inflamatórias, TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C) e IL-22 (D) produzidas por PBMCs de gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não-grávidas, cultivadas por 72h.

Foi observada maior produção de TNF- α (figura 5A) nos grupos PE e MNG quando comparada com o grupo GN, tanto na produção endógena quanto na

estimulada. A produção de IFN- γ (figura 5B) encontra-se endogenamente aumentada em gestantes com PE comparada com gestantes GN. O HA foi capaz ainda de estimular a produção IFN- γ no grupo PE. Em relação à produção de IL-17 (figura 5C), está demonstrado aumento endógeno em gestantes com PE quando comparadas com gestantes normotensas, entretanto o estímulo com HA aumentou a produção da citocina no grupo GN. Já a produção de IL-22 (figura 5D) não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados.

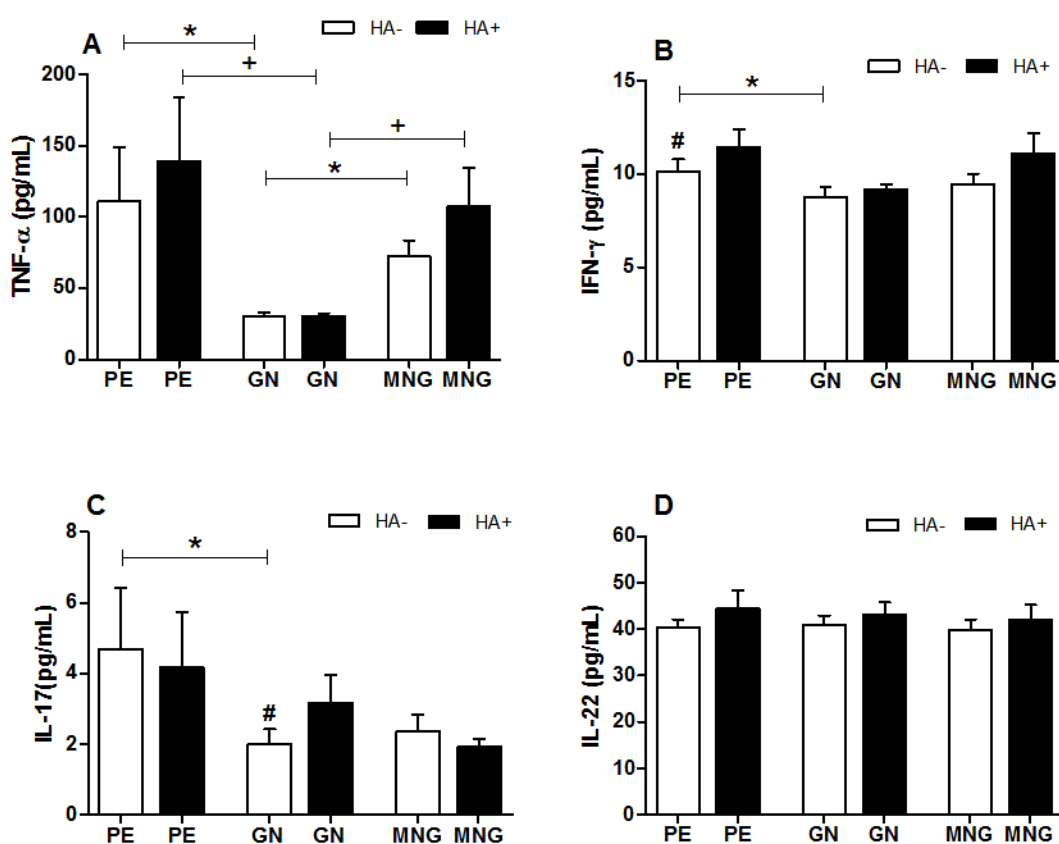


Figura 5. Produção TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C) e IL-22 (D) por células mononucleares de 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres não-grávidas (MNG), não estimuladas (HA-) e estimuladas com hialurona (HA+). Resultados expressos em média $\pm$ SD. # $p < 0,05$ entre grupos HA- e HA+; * $p < 0,05$ entre grupos HA-; + $p < 0,05$ entre grupos HA+ (ANOVA).

Demonstra-se na figura 6 a produção endógena e estimulada por HA de citocinas anti-inflamatórias IL-10 (A), IL-4 (B) e TGF- β 1 (C) produzidas por PBMCs de gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não-grávidas, cultivadas por 72h.

A produção de IL-10 (figura 6A) foi significativamente menor em gestantes com PE quando comparada aos outros grupos, tanto na produção endógena como na estimulada por HA. Não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados quanto à produção de IL-4 (figura 6B). Níveis endogenamente diminuídos de TGF- β 1 (figura 6C) foram encontrados em gestantes com PE quando comparada aos outros grupos estudados e, quando estimulado com HA, observou-se aumento da citocina em gestantes com PE em relação ao grupo GN. O estímulo com HA aumentou a produção de TGF- β 1 em gestantes com PE, ao contrário dos outros grupos estudados que apresentaram diminuição.

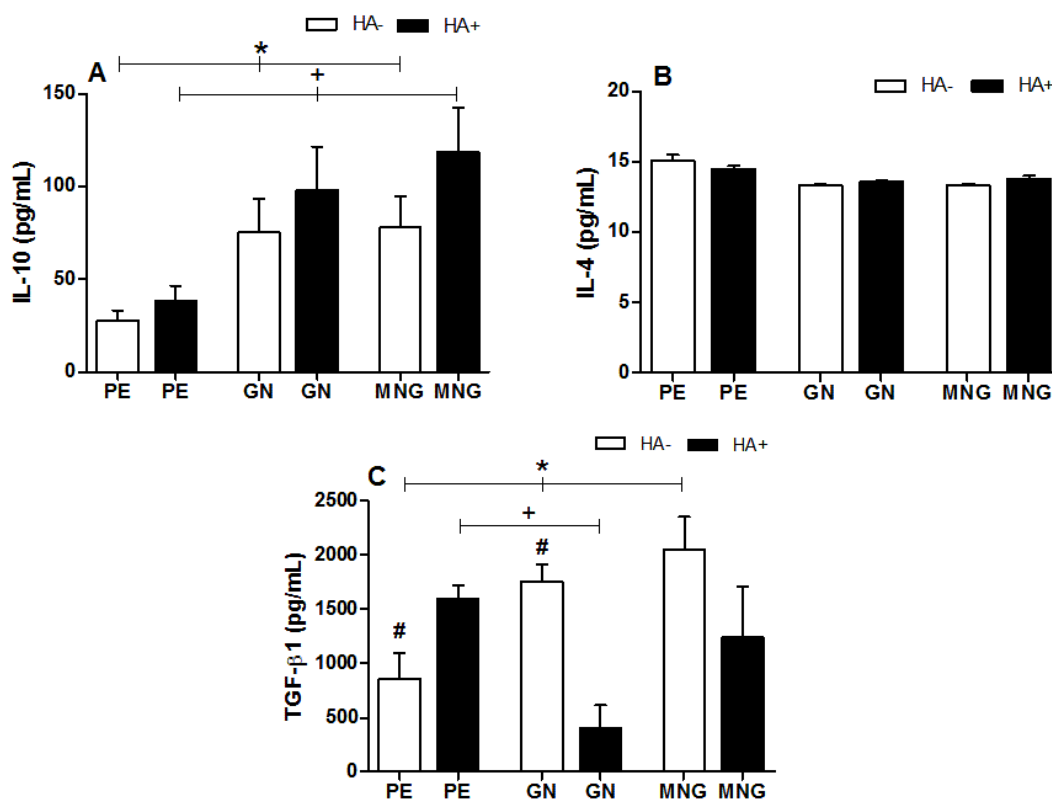


Figura 6. Produção de IL-10 (A), IL-4 (B) e TGF- β 1 (C) por células mononucleares de 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres não-grávidas (MNG), não estimuladas (HA-) e estimuladas com hialurona (HA+). Resultados expressos em média $\pm$ SD. # $p < 0,05$ entre grupos HA- e HA+; * $p < 0,05$ entre grupos HA-; + $p < 0,05$ entre grupos HA+ (ANOVA).

3.3.3. Estímulo com Hsp70

Na figura 7 estão representadas as concentrações endógena e induzida por Hsp70 das citocinas inflamatórias TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C) e IL-22 (D)

produzidas por PBMCs de gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não-grávidas, cultivadas por 72h.

A citocina inflamatória TNF- α (figura 7A) apresentou maior expressão, endógena e estimulada, nos grupos PE e MNG quando comparados com o grupo GN. O estímulo com Hsp70 aumentou a produção de TNF- α nos grupos PE e MNG. A produção de IFN- γ (figura 7B) e IL-17 (figura 7C) encontra-se endogenamente aumentada em gestantes com PE comparada com gestantes GN. Já a produção de IL-22 (figura 5D) não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados.

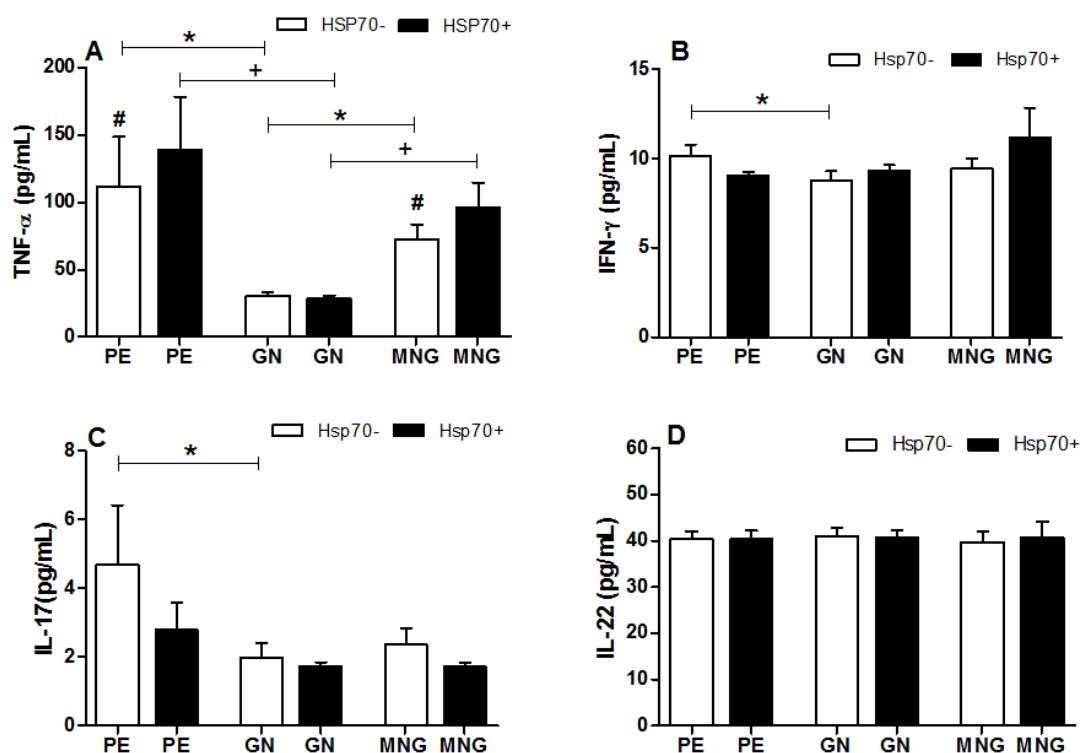


Figura 7. Produção TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-17 (C) e IL-22 (D) por células mononucleares de 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres não-grávidas (MNG), não estimuladas (Hsp70-) e estimuladas com Hsp70 (Hsp70+). Resultados expressos em média $\pm$ SD. # $p < 0,05$ entre grupos Hsp70- e Hsp70+; * $p < 0,05$ entre grupos Hsp70-; + $p < 0,05$ entre grupos Hsp70+ (ANOVA).

Produção endógena e estimulada por Hsp70 de citocinas anti-inflamatórias IL-10 (A), IL-4 (B) e TGF- β 1 (C) produzidas por PBMCs de gestantes portadoras de PE, gestantes normotensas e mulheres não-grávidas, cultivadas por 72h.

A produção de IL-10 (figura 8A), endógena e estimulada por Hsp70, apresenta-se significativamente diminuída em gestantes com PE quando comparada

aos grupos GN e MNG. Além disso, a Hsp70 estimulou a produção de IL-10 no grupo MNG. Não foi observada diferença significativa na produção de IL-4 (figura 8B) entre os grupos estudados. Foi observada menor produção endógena de TGF- β 1 (figura 8C) em gestantes com PE quando comparada aos grupos GN e MNG e, quando essas células foram estimuladas com Hsp70 apresentaram aumento da produção da citocina em gestantes com PE em relação ao grupo GN e MNG, que apresentaram diminuição.

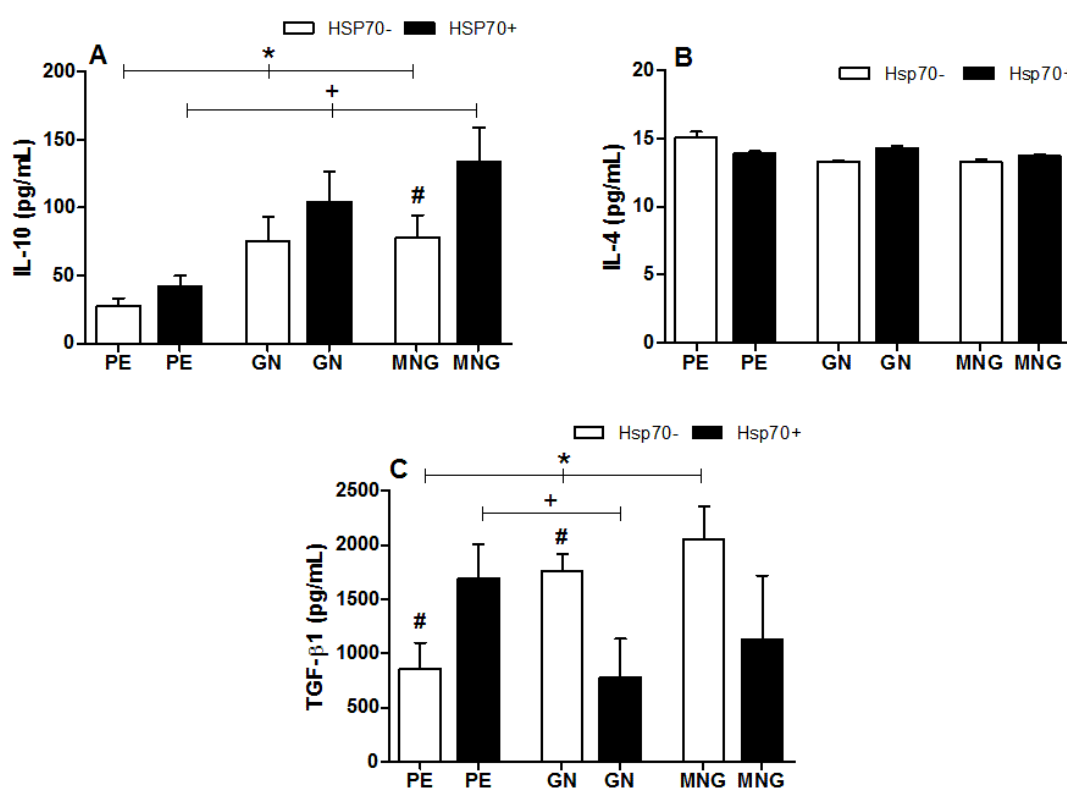


Figura 8. Produção de IL-10 (A), IL-4 (B) e TGF- β 1 (C) por células mononucleares de 20 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres não-grávidas (MNG), não estimuladas (Hsp70-) e estimuladas com Hsp70 (Hsp70+). Resultados expressos em média $\pm$ SD. # p<0,05 entre grupos Hsp70- e Hsp70+; * p<0,05 entre grupos Hsp70-; + p<0,05 entre grupos Hsp70+ (ANOVA).

4. Discussão

O balanço entre células Th17 e Treg é importante para manter a homeostase e orquestrar a resposta imune durante a gestação (Figueiredo & Schumacher, 2016).

No entanto, no presente trabalho foi demonstrado que esse balanço é deficiente na PE, ocorrendo desequilíbrio entre perfil inflamatório e anti-inflamatório de subpopulações de células T CD4+, com polarização para os perfis Th1 e Th17 e diminuição dos perfis Th2/Treg. Esse desequilíbrio também foi comprovado por níveis endógenos elevados de TNF- α , IFN- γ e IL-17, associados à diminuição de IL-10 e TGF- β produzidos por linfócitos de gestantes portadoras de PE.

Esses resultados estão em acordo com dados da literatura demonstrando que gestantes com PE grave apresentam aumento na percentagem de células Th17 e de células Th22 e diminuição de Treg quando comparadas com gestantes normotensas (Zhang et al., 2016). Outros autores estudando sangue do cordão umbilical em gestantes com PE e normotensas (Vargas-Rojas et al., 2015) demonstraram que o perfil Th2/Treg encontra-se diminuído em gestantes com PE, enquanto Cao et al., (2015) demonstraram que o RNAm de Foxp3 está diminuído, e o RNAm de ROR γ encontra-se aumentado em gestantes pré-eclâmpicas em comparação com o gestantes normais. Gestantes com PE apresentam menor percentagem de células expressando fatores intracitoplasmáticos de perfil anti-inflamatório (GATA-3 e FoxP3). No entanto, as células de gestantes com PE que já expressam endogenamente esses fatores, tem maior intensidade de expressão, demonstrada possivelmente pela MIF que não mostrou diferença significativa entre os grupos. Para tentar manter a homeostase e controlar a inflamação presente, já que o perfil Th17 predomina nessa patologia. Os resultados do presente trabalho confirmam resultados anteriores, da literatura, mostrando que a população de células Treg no sangue periférico de gestantes com PE está diminuída (Toldi et al., 2012; Boij et al., 2015).

Os resultados de produção endógena (não estimulada) de citocinas por linfócitos T CD4+ confirmam o perfil Th1/Th17 ativado nessas células, concordando com trabalhos que demonstraram aumento de IFN- γ (Okzan et al., 2014) e IL-17 em plasma de gestantes com pré-eclâmpsia quando comparadas com gestantes normotensas e mulheres não-grávidas (Barnie et al., 2015; Molvarec et al., 2015). O IFN- γ e a IL-17 são citocinas capazes de induzir a resposta inflamatória, sendo assim, a maior produção dessas citocinas por células de gestantes com PE pode auxiliar na inflamação exacerbada observada nessa síndrome. Além dessas o TNF- α também se encontra aumentado em gestantes com PE, corroborando resultados

prévios obtidos em nosso laboratório (Peraçoli et al., 2013). A maior produção endógena de TNF- α em gestantes com PE está de acordo com a literatura (Beckmann et al., 2004; Peraçoli et al., 2007; 2011) e sugere que os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes do TNF- α podem estar associados às manifestações mais graves da PE e ao estresse oxidativo presente nessa patologia.

Assim, a maior produção de IL-10 e TGF- β 1, por células mononucleares de gestantes normotensas pode ser explicada pela predominância de um perfil Th2 anti-inflamatório nessas mulheres, que se desenvolve durante a gestação, com predomínio de IL-10 e TGF- β 1 sobre TNF- α e IFN- γ para minimizar os efeitos deletérios de uma resposta inflamatória excessiva. A maior concentração endógena de IL-10 e TGF- β 1, encontrada em gestantes normotensas em relação às portadoras de PE, observadas no presente estudo, concordam com a literatura (Clausen et al., 2002; Azizieh et al., 2005; Borekci et al., 2007; Cristofalo et al., 2013) mostrando baixos níveis endógenos de IL-10 ou TGF- β 1 em células mononucleares de gestantes com PE comparadas com gestantes normotensas.

A concentração de IL-4 no plasma das gestantes pré-eclâmpicas não apresentou diferença significativa quando comparada com a de gestantes normotensas, corroborando os resultados de outros autores (Tarnowska-Madra et al., 2010; Cemgil Arıkan et al. 2012). Também no encontramos diferenças entre os grupos com relação à concentração plasmática de IL-22. Embora Zhang et al., (2016) estudando gestantes pré-eclâmpsia grave mostraram aumento dessa citocina no plasma, quando comparadas com gestantes normotensas. Consideramos que o papel da IL-22 na PE precisa ser melhor estudado.

Foi ainda observado que as DAMPs são capazes de induzir modulação da resposta imune adaptativa, aumentando a inflamação. A inflamação estéril é suficiente para recriar as principais características das doenças reprodutivas comuns em animais de experimentação, enquanto nos seres humanos, uma parte significativa das gestantes que apresentam pré-eclâmpsia, trabalho de parto prematuro ou outras doenças inflamatórias durante a gravidez não mostram sinais clínicos de infecção (Nadeau-Vallée et al., 2016). A origem das DAMPs, no plasma, não é conhecida, mas existem evidências de que podem ser liberadas a partir de tecidos lesados e células necróticas e incluem componentes de matriz extracelular

degradados, como o hialurona, proteínas de choque térmico (Hsp70), ácido úrico, proteína HMGB1 e ácidos nucleicos, entre outros.

A inflamação estéril é desencadeada quando os DAMPs ativam PRRs ou outros receptores incluindo RAGE e IL-1R, para montar uma resposta imune aguda com a finalidade de resolver a condição adversa que inicialmente levou à liberação da DAMP (Nadeau-Vallée et al., 2016). Na PE, muitas dessas DAMPs são conhecidas por contribuir tanto para a inflamação placentária local como para a inflamação sistêmica e a disfunção endotelial. Conforti-Andreoni et al., (2011) mostraram que a diferenciação de linfócitos T CD4+ em perfil Th17, induzida por ácido úrico, é dependente da ativação do inflamassoma em células dendríticas com consequente produção de IL-1 β , demonstrando que as DAMPs são capazes de modular também a imunidade adaptativa, além da imunidade inata.

Nesse contexto de inflamação estéril é interessante conhecer a capacidade dessas DAMPs em ativar a resposta inflamatória em gestantes portadoras PE. No presente trabalho foi observado que as DAMPs, MSU, HA e Hsp70, foram capazes de modular a produção de citocinas por PBMCs em diferentes intensidades. O estímulo com MSU induziu aumento na produção de IFN- γ e IL-22 em todos os grupos estudados, sugerindo que um ambiente com aumento de MSU pode intensificar a inflamação sistêmica. Observou-se ainda que MSU e HA foram capazes de aumentar a produção de IL-17 em gestantes normotensas, evidenciando que o aumento dessas DAMPs pode levar a uma estado de inflamação sistêmica, como o observado em gestantes portadoras de PE que apresentam aumento endógeno de IL-17.

A DAMPs, MSU, HA e Hsp70 induziram aumento de TGF- β 1 em gestantes portadoras de PE. Considerando que ambientes com alta concentração de TGF- β e IL-6 levam a diferenciação para perfil inflamatório Th17 (Saito et al., 2010; Figueiredo & Schumacher, 2016) a indução desse aumento pode resultar inflamação mais intensa em gestantes com PE. No entanto o estímulo com HA e Hsp70, em gestante normotensas, levou a diminuição na produção dessa citocina, demonstrando a capacidade dessas gestantes em manter a resposta inflamatória sob controle.

O estímulo com MSU e Hsp70 ainda induziu aumento da produção de TNF- α em gestantes com PE e no grupo MNG. Outros trabalhos demonstraram que o MSU

e a Hsp70 induzem a produção de TNF- α , principalmente ligado à ativação da imunidade inata. A indução de estresse oxidativo leva à produção de Hsp70, que regula a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a expressão do gene do TNF- α em monócitos e macrófagos (Mandrekar et al., 2008). Enquanto, Matias et al., (2015) estudando a ativação do inflamassoma induzido por MSU, demonstraram que essa DAMP é capaz de aumentar a produção de TNF- α por monócitos de gestantes com PE.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho mostram que células de gestantes portadoras de PE apresentam ativação endógena para perfil Th1/Th17 e expressão elevada de citocinas inflamatórias. O estímulo com as DAMPs foi capaz de estimular a resposta inflamatória em gestantes pré-eclâmpicas sugerindo que essas alarminas desempenham papel na ativação do sistema imune adaptativo e na liberação de citocinas inflamatórias participando na patogênese dessa importante síndrome da gestação.

5. REFERÊNCIAS

- American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin no. 33. Washington, DC.: ACOG; 2002; 2:229–35.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002; 277:15028-34.
- Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 54:30-7.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001; 167:1245-53.
- Barnie PA, Lin X, Liu Y, Xu H, Su Z. IL-17 producing innate lymphoid cells 3 (ILC3) but not Th17 cells might be the potential danger factor for preeclampsia and other pregnancy associated diseases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8:11100-7.
- 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; 23:319-329.

- Boij R, Mjösberg J, Svensson-Arvelund J, Hjorth M, Berg G, Matthiesen L, Jenmalm MC, Ernerudh J. Regulatory T-cell Subpopulations in Severe or Early-onset Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2015; 74:368-78.
- 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.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Nastasi G, Calatroni A. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80:480-90.
- Cao W, Wang X, Chen T, Zhu H, Xu W, Zhao S, Cheng X, Xia L. The Expression of Notch/Notch Ligand, IL-35, IL-17, and Th17/Treg in Preeclampsia. *Dis Markers*. 2015; 2015:316182.
- Cemgil Arıkan D¹, Aral M, Coskun A, Ozer A. Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon- γ and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012; 25:1569-73.
- Clausen T, Djurovic S, Reseland JE, Berg K, Drevon CA, Henriksen T. Altered plasma concentrations of leptin, transforming growth factor-beta (1) and plasminogen activator inhibitor type 2 at 18 weeks of gestation in women destined to develop pre-eclampsia. Circulating markers of disturbed placentation? *Placenta*. 2002; 23: 380–385.
- Conforti-Andreoni C, Spreafico R, Qian HL, Riteau N, Ryffel B, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. *J Immunol*. 2011; 187:5842-50.
- 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.
- Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Leszczynska-Goarzelak B, Oleszczuk J. The expressions of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol*. 2002; 48:381-6.
- Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Leszczynska-Gorzelak B, Oleszczuk J. Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 58:39-45.
- Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzelak B, Oleszczuk J. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2012; 93:75-81.
- Figueiredo AS, Schumacher A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology*. 2016; 148:13-21.

- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4:330-6.
- Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 2009; 10:241-7.
- Hu D, Chen Y, Zhang W, Wang H, Wang Z, Dong M. Alteration of peripheral CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in pregnancy and pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008; 87:190-4.
- Jianjun Z, Yali H, Zhiquan W, Mingming Z, Xia Z. Imbalance of T-cell transcription factors contributes to the Th1 type immunity predominant in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63:38-45.
- Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P, Sooranna SR, Steer PJ. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction? *Br J Obstet Gynaecol.* 2002; 109:836-9.
- Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2008; 15:231-42.
- 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.
- Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25(+) CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol.* 2000; 12:1145-55.
- Land WG. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Part I - Promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2015; 15:e9-e21.
- Lasigliè D, Traggiai E, Federici S, Alessio M, Buoncompagni A, Accogli A, Chiesa S, Penco F, Martini A, Gattorno M. Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLPR3 mutated patients. *PLoS One.* 2011; 6:e20014.
- Liu D, Rhebergen AM, Eisenbarth SC. Licensing Adaptive Immunity by NOD-Like Receptors. *Front Immunol.* 2013; 27;4:486.
- Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.* 2006; 118:268-75.
- Mandrekar P, Catalano D, Jeliaskova V, Kodys K. Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for TNF-alpha regulation. *J Leukoc Biol.* 2008; 84:1335-45.
- 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.

- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296:301-5.
- Mol BW, Roberts CT, Thangaratnam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Preeclampsia. *Lancet*. 2016; 387:999-1011.
- Molvarec A, Czegle I, Szijártó J, Rigó J Jr. Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2015; 112:53-7.
- 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.
- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183:S1-S22.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001; 276:10229-33.
- Ozkan ZS¹, Simsek M, Ilhan F, Deveci D, Godekmerdan A, Sapmaz E. Plasma IL-17, IL-35, interferon- γ , SOCS3 and TGF- β levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014; 27:1513-7.
- Paeschke S, Chen F, Horn N, Fotopoulou C, Zambon-Bertoja A, Sollwedel A, Zenclussen ML, Casalis PA, Dudenhausen JW, Volk HD, Zenclussen AC. Pre-eclampsia is not associated with changes in the levels of regulatory T cells in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 54:384-9.
- Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology*. 2010; 129:147-53
- Peracoli JC, Rudge MVC, Peracoli 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 MT, Menegon FT, Borges VT, de Araújo Costa RA, Thomazini-Santos IA, Peraçoli JC. Platelet aggregation and TGF-beta1 plasma levels in pregnant women with preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2008; 79:79-84.
- Peraçoli MT, Bannwart CF, Cristofalo R, Borges VT, Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 66:460-7.
- Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romão 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.

- Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013; 22:8-19.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta*. 2003; 24:S21-S27.
- Romao-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VTM, Araujo Jr JP, Peracoli JC, Peracoli MT. DAMPs induce inflammation in pregnant women with preeclampsia. *Immunol*. 2017 (submetido)
- Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2003; 59:161-73.
- Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2007;28:192-209 (b).
- Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. *Semin Immunopathol*. 2007; 29:115-22 (a).
- Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 1999; 41:297-306.
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010; 63:601-10.
- Saito S. Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. *Immunol Cell Biol*. 2010; 88:615-7.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev*. 2001; 182:18-32.
- Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol*. 2009; 183:7023-30.
- Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*. 2007; 149:139-45.
- Tarnowska-Madra U, Leibschang J, Kowalska B, Filipp E, Kozar A, Maciejewski T. Levels of immunoreactive cytokines in serum of women with preeclampsia or severe pregnancy hypertension. *Ginek Pol*. 2010; 81:192-6.
- Toldi G¹, Saito S, Shima T, Halmos A, Veresh Z, Vászárhelyi B, Rigó J Jr, Molvarec A. The frequency of peripheral blood CD4+ CD25^{high} FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 68:175-80.

- Tosun M, Celik H, Avci B, Yavuz E, Alper T, Malatyalioglu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010; 23:880-6.
- 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.
- Vargas-Rojas MI, Solleiro-Villavicencio H, Soto-Vega E. Th1, Th2, Th17 and Treg levels in umbilical cord blood in preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;1-4.
- Waldmann H, Graca L, Cobbold S, Adams E, Tone M, Tone Y. Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin Immunol.* 2004; 16:119-26.
- Zhang Z, Liu H, Shi Y, Xu N, Wang Y, Li A, Song W. Increased circulating Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2016; 11:1-8.



CONCLUSÕES

Conclusões:

- a) Os resultados do capítulo 1 mostram que monócitos de gestantes portadoras de PE apresentam ativação endógena dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e secretam níveis mais elevados de IL-1 β , IL-18 e TNF- α . O estímulo de monócitos com MSU, induzindo maior expressão gênica do receptor NLRP3 e caspase-1, bem como a produção de IL-18 foi mais evidente nos grupos de gestantes pré-eclâmpicas e de mulheres não grávidas e demonstra o papel do ácido úrico na ativação do inflamassoma NLRP3 e na liberação de citocinas inflamatórias, sugerindo a participação desse complexo inflamatório na patogênese da pré-eclâmpsia.
- b) Os resultados do capítulo 2 mostram que monócitos de gestantes portadoras de PE apresentam ativação endógena dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e expressam níveis elevados de IL-1 β , IL-18, HMGB1 e TNF- α . O estímulo de monócitos com HA induziu maior expressão gênica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β e HMGB1, bem como a produção de IL-1 β foi mais evidente nos grupos de gestantes pré-eclâmpicas e de mulheres não grávidas. O estímulo de monócitos com Hsp70 contribuiu para produção de IL-1 β e TNF- α por essas células por meio de mecanismo independente de ativação dos inflamassomas. Esses resultados sugerem a participação dessas DAMPs na resposta inflamatória sistêmica, característica da PE.
- c) Os resultados do capítulo 3 mostram que células de gestantes portadoras de PE apresentam ativação endógena para perfil Th1/Th17 e expressão elevada de citocinas inflamatórias. O estímulo de células mononucleares do sangue periférico com as DAMPs foi capaz de induzir a resposta inflamatória em gestantes pré-eclâmpicas sugerindo que essas alarminas desempenham papel na ativação do sistema imune adaptativo e na liberação de citocinas inflamatórias participando na patogênese dessa importante síndrome da gestação.

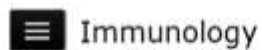


ANEXOS

ANEXO 1 – Artigo submetido para publicação

ScholarOne Manuscripts

<https://mc.manuscriptcentral.com/imm>



Home

Author

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to Immunology

Manuscript ID IMM-2017-4552

Title Induction of systemic inflammation by hyaluronan and hsp70 in women with preeclampsia

Authors Romao-Veiga, Mariana
Matias, Mariana
Ribeiro, Vanessa
Nunes, Priscila
Borges, Vera
Araújo Jr, João
Peracoli, Jose
Peracoli, Maria

Date Submitted 20-Jan-2017

Author Dashboard



Induction of systemic inflammation by hyaluronan and hsp70 in women with preeclampsia

Journal:	<i>Immunology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Romao-Velga, Mariana; Sao Paulo State University, Microbiology and Immunology Matias, Mariana; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Ribeiro, Vanessa; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Nunes, Priscila; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Borges, Vera; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Araújo Jr, João; Sao Paulo State University, Microbiology and Immunology Peracoli, Jose; Sao Paulo State University, Gynaecology and Obstetrics Peracoli, Maria; Sao Paulo State University, Microbiology and Immunology
Key Words:	Cytokines, Inflammation, Reproductive Immunology, Inhibitory/activating receptors

SCHOLARONE™
Manuscripts

Induction of systemic inflammation by hyaluronan and hsp70 in women with preeclampsia

Mariana Romão-Veiga¹; Mariana Leticia Matias²; Vanessa Rocha Ribeiro²; Priscila Rezeck Nunes²; Vera Therezinha M. Borges²; João P. Araújo Junior¹; José Carlos Peraçoli²; Maria Terezinha S. Peraçoli¹

¹ *Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, 18618-691, Botucatu, São Paulo, Brazil*

² *Department of Gynaecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil*

Short title: DAMPs involvement in systemic inflammation of preeclampsia

Keywords: cytokines; DAMPs; inflammasomes; monocytes; preeclampsia

***Correspondence:** Mariana Romao-Veiga, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, Rubiao Junior s/n, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, CEP 18618-691 Brazil. phone: 55 14 38800431; E-mail: maromao14@gmail.com

Abbreviations:

cDNA:complementary DNA; **DAMPs:** damage-associated molecular patterns; **EDTA:**ethylenediamine tetra acetic acid; **ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay; **GAPDH:** glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; **HA:** hyaluronan; **HMGB1:** high

mobility group box 1; **Hsp70**: heat shock protein 70; **IL**: interleukin; **RPMI**: Roswell Park Memorial Institute; **NLRP**: nod-like receptor pyrin domain containing; **PRRs**: pattern recognition receptors; **RT-qPCR**: real-time quantitative polymerase chain reaction; **TLR**: toll-like receptor; **TNF- α** : tumor necrosis factor alpha;

Summary

Preeclampsia (PE) is a human pregnancy syndrome with abnormal activation of innate immune response. The present study aimed to evaluate the involvement of the molecular structures called damage-associated molecular patterns (DAMPs), such as hyaluronan (HA) and heat shock proteins (Hsp) in NLRP1 and NLRP3 inflammasomes activation in peripheral blood monocytes. Twenty women with PE, 20 normotensive pregnant women (NT) and 20 non-pregnant women (NP) were studied. Enzyme immunoassay was employed for HA, Hsp70 and High mobility group Box 1 (HMGB1) determination in plasma, as well as for Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-18 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) detection in supernatant of monocytes cultured with or without HA and Hsp70. The inflammasome induction was evaluated by the quantification of mRNA for NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , IL-18, HMGB1 and TNF- α by RT-qPCR in monocyte culture. Results demonstrated significant higher plasma levels of HA, Hsp70 and HMGB1 in preeclamptic women than in normotensive pregnant and non-pregnant women. Monocytes from women with PE show endogenous activation of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes, and express high levels of IL-1 β , IL-18, HMGB1 and TNF- α . Stimulation of monocytes with HA induced increased gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β and HMGB1, as well as higher production of IL-1 β in pre-eclamptic and non-pregnant women than in normotensive pregnant women. Stimulation of monocytes with Hsp70 contributed to the production of IL-1 β and TNF- α by

these cells through a mechanism independent of inflammasome activation. These results suggest the participation of these DAMPs in the systemic inflammatory response characteristic of PE.

Introduction

Pregnancy requires maternal adaptation, tightly controlled by innate and adaptive immunity, to allow normal growth and development of the fetal semi-graft.¹ During human pregnancy the leading cause of morbidity, mortality and premature labor from 2 to 10% of pregnancies,² is preeclampsia (PE), a specific syndrome of pregnancy. The clinical parameters that identify this pathology are the onset of hypertension (BP $\geq$ 140 x 90 mmHg) and proteinuria ($\geq$ 300 mg / 24h) from the 20 weeks of gestation.³ Other maternal disorders, also related to PE, are: kidney failure, liver involvement, neurologic or hematologic complications, uteroplacental dysfunction or fetal growth restriction.^{4,5}

Activation of inflammatory cells such as monocytes and granulocytes, and endothelial cells is observed in PE^{6,7} as well as excessive production of proinflammatory cytokines^{8,9} and lower concentrations of IL-10 in the circulation or produced endogenously by monocytes from peripheral blood.^{10,11} The endogenous production of tumor necrosis factor (TNF- α) by peripheral blood monocytes is significantly higher in pre-eclamptic women than in normal pregnancies, suggesting the activate state of these cells.^{8,11,12}

The peripheral blood leukocyte activation state in women with PE is associated with genes related to inflammation. These leukocytes show hyper-regulation of the light chain gene of NF- κ B (NF- κ B-1A) in pre-eclamptic women,¹³ and an association between increase in NF- κ B activation and higher production of TNF- α and IL-1 β by mononuclear cells of pre-eclamptic pregnant women as compared to normotensive pregnant women.¹⁴ The higher production of TNF- α and IL-1 β in women with PE suggests that the deleterious effects of

high circulating concentrations of these cytokines may be associated with more severe manifestations of PE.

The intense inflammatory response in PE seems to be related to the release of substances capable of inducing inflammation and cellular components present in plasma, derived from proteins, polysaccharides and lipids, as well as extracellular matrix products, which are called damage-associated molecular patterns (DAMPs) and are considered important modulators of the inflammatory response. The DAMPs are represented by molecules such as uric acid,¹⁵ reactive oxygen species, heat shock proteins (Hsps),^{16,17} proteins released from cells as HMGB1¹⁸ and products released from the extracellular matrix such as fibronectin and hyaluronan.¹⁹⁻²¹

The Hsps are ubiquitous and phylogenetically conserved molecules with chaperone functions and cytoprotective activity,²² present in all organisms.²³ The release of Hsp70 by monocytes/macrophages acts as "danger signal" stimulating TNF- α , IL-6 and IL-8 production by the lineage of human macrophages THP-1.²⁴ Elevated plasma concentration of Hsp70 is described in pregnant women with early-onset PE which is significantly higher than those obtained in pregnant women with late-onset PE.¹⁰

High mobility group box 1 (HMGB1) was originally described as a strictly nuclear protein present in almost all cell types,²⁵ because of its binding to DNA and by playing a role in transcription, repair and replication of genes,²⁶ and posteriorly it was considered as cytokine with potent inflammatory activity due to its extranuclear functions.²⁷ In inflammatory conditions or injury, HMGB1 may be actively secreted by cells of innate immunity such as macrophages and monocytes or is passively released by necrotic cells, and considered as "danger signal",²⁸ acting as a proinflammatory mediator.²⁹ Release of HMGB1 in endotoxemia is dependent on NLRP3 inflammasome activation.³⁰ This protein levels is

increased in plasma of pre-eclamptic women compared with normotensive pregnant women³¹ and may contribute to the development of the inflammatory response in patients with PE.³²

Hyaluronan (HA) is a glycosaminoglycan of the extracellular matrix, which suffers rapid degradation in inflammatory environments, resulting in the accumulation of low molecular weight fragments.²⁰ These fragments activate proinflammatory response via Toll-like receptors (TLR) 2 and TLR4, and can also activate NLRP3 inflammasome acting as a DAMP.³³ On the other hand, high molecular weight HA generates anti-inflammatory response.^{34,35} Elevated plasma levels of HA are described in women with PE.^{36,37} Then, DAMPs exert their inflammatory effect by interacting with pattern recognition receptors (PRRs) expressed on innate immune cells. These receptors are considered a central component of the innate immune system which is involved in the inflammatory response in monocytes.^{38,39}

The major PRRs are Toll-like receptors (TLRs) and NLR receptors (nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat-containing receptor) which recognize and bind molecules present on the surface of pathogens,⁴⁰ and endogenous products from host cells, which are released during tissue damage and denominated "alarmins" or DAMPs.^{38,41} Activation of NLR receptors by DAMPs induces several identical NLRP3 proteins that form an oligomer, which binds to the inactive precursor form of caspase-1, an important inflammatory protein synthesized as pro-caspase-1 and becomes biologically active when inflammasome starts its formation process.^{42,43} Caspase-1 is responsible for cleaving pro-IL-1 β and pro-IL-18 to IL-1 β and IL-18 biologically active forms that are subsequently secreted into the extracellular medium.^{44,45}

Some evidence indicates that NLRP3 plays a role in inflammatory diseases such as atherosclerosis, gout and diabetes type I.⁴⁶⁻⁴⁸ However, different binders and the exact mechanism of NLRP3 inflammasome activation are still poorly understood.⁴³ Several

endogenous molecules, considered as danger signals such as uric acid crystals, cholesterol crystals, hyaluronan, derived oxygen free radicals and fatty acids when in high concentrations induce NLRP3 inflammasome activation, playing an important role in inflammatory diseases. Monocytes from pre-eclamptic pregnant women exhibit endogenous hyperactivation of the inflammatory complex, represented by increased gene and protein expression of NLRP3, caspase-1, IL-1 β and TNF- α compared to normotensive pregnant women.¹⁵ According to Yang *et al.*,⁴⁹ a better understanding of the specific nature of this inflammasome would be important to reveal the molecular pathophysiology of various inflammatory diseases and to identify potential therapeutics for the control of these diseases.

Literature data show that PE has exacerbated inflammatory response, represented by the activation of innate immunity cells.^{7,15} Therefore, the knowledge of inflammasome pathways in monocytes activated by DAMPs and the profile of cytokines produced by peripheral blood monocytes of women with PE may contribute to a better understanding of the involvement of the innate immunity in the pathophysiology of this important gestational pathology.

This study aimed to evaluate the involvement of the DAMPs, hyaluronan and HSP70 on activation of NLRP1 and NLRP3 inflamassomes in monocytes of women with PE, normotensive pregnant and non-pregnant women.

Materials and Methods

Subjects

The study comprised 40 pregnant women without a previous history of hypertension or obstetric and medical complications, admitted to the Obstetric Unit of Botucatu Medical School, Botucatu, SP. Twenty women were diagnosed with preeclampsia (PE), defined as a

persistent elevated blood pressure value of 140 x 90 mmHg and proteinuria (≥ 300 mg in urine collected during 24 hours) after the 20th weeks of gestation (NHBPEP, 2000). A group of 20 pregnant women with an uncomplicated pregnancy that remained normotensive and nonproteinuric were recruited as controls and matched for gestational age with the pre-eclamptic group. Gestational age was calculated from the last menstrual period and confirmed by early (<12 weeks gestation) ultrasound examination. It was also included in the study 20 healthy women, non-pregnant, volunteer donors of the Blood Bank from the Hemocenter of the Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil, added to establish the comparison of immunological parameters between groups. Proteinuria in 24-hour urine was measured by a colorimetric method, the Technicon RAXT automation system, and uric acid was assessed by uric acid enzymatic Trinder (Biotrol Diagnostic) in the Clinical Laboratory of Botucatu Medical School – UNESP. Exclusion criteria included multiple gestation, prior preeclampsia, illicit drug use, and preexisting medical conditions such as diabetes, chronic hypertension, and renal disease. The study was approved by the Ethics Committee of the Botucatu Medical School, and written informed consent was obtained from all women involved in the study. For pregnant women with age below 18 years old the written informed consent was obtained from their parents or guardians.

Blood sampling

The blood collection, for the evaluation of DAMPs, gene expression and cytokines production by monocytes from women with PE was collected at the time of disease diagnosis, and from the normotensive pregnant women at the time they were matched for gestational age with women with PE. The blood of non-pregnant women was obtained during blood donation. Blood was collected into plastic tubes containing 5% EDTA. Ten milliliters of blood was collected by venipuncture from the antecubital vein of PE, NT and NP women, and after clot

formation the samples were centrifuged at 4 °C for 10 min at 1200 g. The plasma fraction was stored in aliquots at -80 °C until the analyses were performed.

Monocyte cultures

After plasma separation, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque Premium [density (d) = 1.077] (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) as previously described.¹² Briefly, 10 mL of blood was mixed with an equal volume of RPMI 1640 tissue culture medium (Sigma-Aldrich, Chemical Co., St Louis, Missouri, USA) containing 2 mM L-glutamine, 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 20 mM HEPES, and 40 µg/mL gentamicin (complete medium). Samples were layered over 5 mL Ficoll-Paque Premium in a 15 mL conical plastic centrifuge tube. After centrifuging at 400 g for 30 minutes at room temperature, the interface layer of PBMC was carefully aspirated and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05 mM ethylenediaminetetraacetic acid (PBS-EDTA) and once with complete medium, with centrifugation in between washes at 300 g for 10 minutes. Cell viability, as determined by 0.2% Trypan Blue dye exclusion, was >95% in all experiments. Monocytes were counted using neutral red (0.02%) in PBMC suspension and 5×10^5 monocytes/mL in complete medium were distributed (1 mL/well) in 24-well flat-bottomed plates (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA). After incubation for 2 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, non-adherent cells were removed by aspiration and each well rinsed twice with complete medium. Monocyte preparations routinely contained >90% monocytes as determined by morphologic examination and staining for nonspecific esterase.⁵⁰ Monocytes were incubated with complete medium in the presence or absence of 100 µg/mL of hyaluronan (HA) (R&D Systems) or 2.5 ng/mL of Hsp70 (Sigma-Aldrich) for 18 h at 37 °C in 5% CO₂. The concentrations of HA and Hsp70 used as stimulus in monocytes cultures was previously standardized employing

monocytes from five health non-pregnant women. Culture supernatants were harvested and stored at -80 °C for cytokine determination.

DAMPs and cytokines determination

For quantification of DAMPs (Hyaluronan, Hsp70) in plasma and IL-1 β and TNF- α cytokines in supernatants of monocytes cultured with or without hyaluronan (HA) or Hsp70, specific commercial kits obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) were employed. IL-18 was determined by quantitative test kit ELISA for human IL-18 (MBL – Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan). HMGB1 was quantified in plasma using IBL kit International - Shino Test (Hamburg, Germany). In the tests, the concentrations of monoclonal and polyclonal antibodies, as well as specific recombinant used in standard curves were those recommended by the manufacturer. Assay sensitivity limits were 0.4 ng/mL de hyaluronan, 125 pg/mL de Hsp70, 0.1 ng/mL de HMGB1, 3.9 pg/mL de IL-1 β , 12.5 pg/mL de IL-18 and 15.6 pg/mL de TNF- α .

Expression of transcripts related to inflammation

Monocytes were incubated with complete medium in the presence or absence of 100 μ g/mL of HA (R&D Systems) or 2.5 ng/mL of Hsp70 (Sigma-Aldrich) for 4 h at 37 °C in 5% CO₂ and were subjected to analysis of the expression on transcriptional level of the gene encoding the proteins NLRP1, NLRP3, caspase-1, HMGB1, IL-1 β , IL-18 and TNF- α . Glybenclamide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at concentration of 50 and 200 μ M was added to cultures of monocytes from non-pregnant women for 30 min, and then HA (100 μ g/mL) was added to the culture for another 4h in order to evaluate its inhibitory effect on NLRP3 inflammasome activation by HA. Total RNA was extracted from monocytes through the

system Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, Canada) according to manufacturer's protocol. After extraction 1 µg of total RNA was incubated with DNase I Amp Grade (Invitrogen). The purity and relative quality of samples obtained were determined by fluorometry using Qubit® Fluorometric Quantitation, Thermo Scientific™. Subsequently, the synthesis of complementary DNA (cDNA) was conducted with 450 ng of total RNA in 60 µl reaction using ImProm-II™ Reverse Transcription System, according to manufacturer's protocol. The quantification of gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1β, IL-18 and TNF-α was made through the reaction technique in quantitative Polymerase Chain in real time (RT-qPCR) using RT GoTaq® -qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) according to Matias *et al.*¹⁵ The device used was 7500 Fast Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA). The primer sequences used in this study are in table 1.

Expression values of the analyzed transcripts were normalized based on the concurrent analysis of the expression of the enzyme encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH). The calculation of the differential expression of selected genes was carried out by the data processing method compared to a standard curve.⁵¹ All conditions, including GAPDH for each sample and the negative control reaction (template Control - NTC, no DNA) were analyzed in duplicates. To analyze the relative expression, after the analysis of gene expression, we chose an RNA sample obtained from each group, which received the relative value of 100. All other samples received values for that sample.

Statistical Analysis

The results were evaluated by non-parametric methods, Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney *U* test, using the statistical program PRISM, (Graph Prism for Windows, version 6.01, GraphPad, CA, USA). Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Clinical characteristics

Analysis of the clinical characteristics of women with PE, normotensive (NT) pregnant women and non-pregnant (NP) women (Table 2) showed no statistical difference in age and race parameters between the groups studied. Similarly, there was no significant difference in gestational age and parity between women with PE and NT pregnant women. Systolic and diastolic blood pressure were significantly higher in pre-eclamptic group ($p < 0.05$) than in NT and NP groups. Additionally, proteinuria levels were significantly higher ($p < 0.05$) in women with PE compared to NT pregnant women.

Concentration of DAMPs in plasma

Plasma concentrations of Hyaluronan, Hsp70 and HMGB1 were significantly higher in women with PE compared with NT and NP women (Table 3).

Gene expression of inflammasome proteins and cytokines in monocytes stimulated with hyaluronan

The gene expression of NLRP1 and NLRP3 (Fig. 1A and Fig. 1B) is increased in monocytes from women with PE, stimulated or not with Hyaluronan (HA), when compared to the NT and NP groups. It is also possible to notice lower gene expression of NLRP1 and NLRP3 in monocytes stimulated or not with HA in NT group compared with the NP group. The PE group showed significant difference between non-stimulated monocytes (HA⁻) and the stimulated (HA⁺) ones with increased NLRP1 and NLRP3 expression in stimulated cells.

Higher gene expression of caspase-1 (Fig. 1C) was detected in monocytes stimulated or not with HA of PE group compared with NT group; however when PE group was

compared with NP group a significant difference was detected only in unstimulated monocytes. Moreover, caspase-1 expression in monocyte stimulated or not with HA was lower in NT women compared with NP group. The PE and NP groups showed significant difference between monocytes unstimulated (HA^-) and stimulated (HA^+) with increased caspase-1 expression in stimulated cells.

Figure 1D shows that 200 μM of glybenclamide, an inhibitor of NLRP3 inflammasome, is capable of decrease the expression of caspase-1 in monocytes from NP women, even when these cells were stimulated with HA (HA^+).

The increase in the gene expression of IL-1 β is seen in monocytes of women with PE, stimulated or not with HA when compared with the NT and NP groups (Fig. 2A). Furthermore, a decrease in gene expression of IL-1 β was detected in monocytes stimulated or not with HA from NT group when compared with the NP group. It was also demonstrated that the stimulus with HA (HA^+) induced increase in IL-1 β gene expression in monocytes of women with PE and NP group. Glybenclamide at 200 μM concentration was able of inhibiting IL-1 β expression by monocytes from non-pregnant women, even when these cells were stimulated with HA (HA^+) (Fig. 2C).

A significant higher gene expression of IL-18 (Fig. 2B) and HMGB1 (Fig. 2C) was detected in monocytes from women with PE, stimulated or not with HA compared with NT group. In addition, monocytes from the NT group stimulated with HA, presented lower gene expression of this cytokine in relation to the NP group. Lower expression of HMGB1 gene was detected in monocytes from NT group, stimulated with HA and compared to the NP group. Figure 2E shows a large increase in TNF- α gene expression in monocytes from women with PE, whether or not stimulated with HA, when compared to the NT and NP groups. However, the group of NT women presented lower expression of TNF- α in monocytes stimulated with HA (HA^+) than in the NP group. In addition, there is a significant difference

between the gene expression of TNF- α in non-stimulated (HA⁻) and HA-stimulated (HA⁺) monocytes, in pregnant women of PE and NP groups.

Production of cytokines by monocytes stimulated or not with HA

Figure 3A shows that monocytes from women with PE produced significantly higher basal levels of IL-1 β than those of NT and NP groups. Cell stimulation with HA induced higher IL-1 β production by pre-eclamptic women only when compared to the NT group. It is also possible to note decreased cytokine levels in HA-stimulated monocytes from NT group compared to the NP group. In addition, there is a significant difference the in the production of IL-1 β by monocytes from the three groups studied, between basal and stimulated with HA (HA⁺) cytokine production by these cells.

Increased IL-18 production was detected in non-stimulated monocyte cultures from women with PE when compared to the NT group (Fig. 3B). Lower IL-18 levels was also produced by non-stimulated monocytes from NT group when compared to the NP group. However, significantly lower production of IL-18 was observed by monocytes from women with PE and NP women stimulated with HA (HA⁺) when compared to basal production by cells that were not stimulated (HA⁻).

Figure 3C shows higher endogenous and HA-stimulated production of TNF- α HA by monocytes of women with PE in relation to the NT group. It is also possible to note lower release of TNF- α protein by monocytes from NT pregnant women, stimulated or not with HA, when compared to the NP group. In addition, monocytes from NP women stimulated with HA (HA⁺) had higher production of TNF- α than endogenous production by these cells. There was no significant difference between basal and HA stimulated (HA⁺) levels in monocytes of pre-eclamptic women.

Gene expression of inflammasome proteins and cytokines in monocytes stimulated with Hsp70

Gene expression of NLRP1, NLRP3 and caspase-1 (Figs 4A, 4B and 4C) is significantly increased in monocytes from women with PE, stimulated or not with Hsp70 compared to the NT and NP groups. Lower expression of these genes was observed in monocytes from NT women, stimulated or not with Hsp70, when compared to the NP group. The stimulation with Hsp70 did not alter the gene expression of NLRP1, NLRP3 and caspase-1 in the three groups studied.

Increased gene expression of IL-1 β cytokine (Fig. 5A) was detected in monocytes cultured with or without Hsp70 of women with PE compared to the NT and NP groups. However, the NT group shows a decrease in IL-1 β gene expression in monocytes stimulated or not with Hsp70 when compared to the NP group. Gene expression of IL-18 (Fig. 5B) and HMGB1 (Fig. 5C) both endogenous and stimulated by HspP70 in monocytes of women with PE were increased in relation to the NT group. Lower gene expression of HMGB1 was detected in monocytes from NT pregnant women, stimulated with Hsp70 than in NP group. Stimulation with Hsp70 did not increased gene expression of IL-1 β , IL-18 and HMGB1 by monocytes from the three groups studied.

Figure 5D shows increased gene expression of TNF- α in monocytes of women with PE, stimulated or not with Hsp70, when compared with the NT and NP groups. In addition, a significant difference was observed between the gene expression of TNF- α in non-stimulated (Hsp70 $^-$) and stimulated with Hsp70 (Hsp70 $^+$) monocytes in all groups studied.

Production of cytokines by monocytes stimulated or not with HSP70

Figure 6A shows that endogenous production of IL-1 β by monocytes from women with PE was significantly higher than in NT and NP groups. The stimulation of cells from NT pregnant women with Hsp70 induced lower IL-1 β production compared to the PE and NP groups. In addition, significant differences were detected between cultures of monocytes stimulated with Hsp70 (Hsp70⁺) and the basal (Hsp70⁻) production by these cells in the three groups studied.

Basal production of IL-18 was significantly higher in monocyte cultures from women with PE than in NT group (Fig. 6B). There is also a decrease in the endogenous cytokine levels in monocytes from NT group compared to the NP group. Stimulation with Hsp70 did not increase IL-18 production by monocytes of the PE, NT and NP groups.

Figure 6C shows higher TNF- α production in non-stimulated and Hsp70-stimulated (Hsp70⁺) monocyte cultures of PE and NP groups than those of NT group. In addition, monocytes from the three groups studied produced higher levels of TNF- α after Hsp70 stimulation in relation to the basal production by these cells.

Discussion

The present study evaluated the participation of the DAMPs, HA, Hsp70 and HMGB1 in the systemic inflammatory response observed in PE. The results of significantly higher plasma concentrations of these DAMPs in women with PE compared with normotensive pregnant women and non-pregnant women confirm previous studies in the literature showing elevated systemic levels of these DAMPs in pre-eclamptic women and their participation in the pathogenesis of PE.^{10,31,32,36,37} The origin of these DAMPs in plasma is unknown, but there is evidence that they can be released from damaged tissues and necrotic cells and include degraded extracellular matrix components, heat shock proteins, HMGB1 protein and nucleic

acids, among others. In PE, many of these DAMPs are known to contribute to both local placental and systemic inflammation as well as endothelial dysfunction. Considering that in the PE the placental syncytiotrophoblast is submitted to oxidative and inflammatory stress, inflammatory molecules like Hsp70, HMGB1, Galectin 3 and Syncytin 1 are transported by microvesicles and can act as DAMPs in both placenta and peripheral blood mononuclear cells in women with PE.⁵² Thus, placental release of microvesicles and nanovesicles from the syncytiotrophoblast to the maternal circulation may exert pro-inflammatory, antiendothelial and pro-coagulant activity in vitro, characteristics of this maternal syndrome.^{29,53} According to Khan & Hay,⁵⁴ it is possible that these microparticles can act as DAMPs, inducing inflammasome hyperactivation and resulting in exaggerated inflammatory state in PE. In recent work we have demonstrated the activation of the NLRP3 inflammasome in placenta from pre-eclamptic women, represented by increased gene expression of NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α , HMGB1 and elevated levels of caspase-1 and these inflammatory cytokines in placental tissue.⁵⁵

The analysis of the gene expression of caspase-1 NLRP1 and NLRP3, as well as of IL-1 β , IL-18, HMGB1 and TNF- α in peripheral blood monocytes of women with PE showed that these parameters were elevated in women with PE and confirm previous results of the spontaneous activation of these inflammasome in these patients.¹⁵ These results associated with increased protein expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and HMGB1 indicate endogenous activation of these cells when compared to monocytes of normotensive pregnant women. Thus, the spontaneous basal activation of inflammasomes in circulating monocytes of pre-eclamptic women suggests that these cells can be activated by alarmins or DAMPs present in plasma. It is reported that such inflammation-promoting complexes can be activated by host-derived molecules, demonstrating that the immune system is not only capable of recognizing foreign particles, but may also reacts to endogenous cell damage

indicators such as extracellular ATP,⁵⁶ metabolic stress,⁵⁷ hyaluronan, one of the main components of the extracellular matrix that is released during tissue injury,³³ uric acid, reactive oxygen intermediates, among other DAMPs.²¹

Monocytes from pre-eclamptic women stimulate with HA showed an increase in the gene expression of NLRP3 and caspase-1, confirming the results of Yamazaki *et al.*³³ However, the cells of women with PE also showed increased gene expression of NLRP1 when stimulated with HA. This bound may be explained due to an NLRP1 polymorphism variant rs12150220 (L155H) found in women with PE.⁵⁸

The gene expression of IL-1 β , TNF- α and HMGB1 in monocytes from pre-eclamptic women and non-pregnant women stimulated with HA was increased when compared with normotensive pregnant women. These results, together with the decrease in expression of caspase-1 and IL-1 β when monocytes were cultured with HA plus glybenclamide, an inhibitor of the inflammasome,⁵⁹ demonstrated that HA play a role in inflammasome-induction, leading to inflammatory activity of these cells. The results of the activation of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes in monocytes from pre-eclamptic and non-pregnant women induced by HA are similar to those obtained previously by these cell stimulation with monosodium urate¹⁵ and suggest that the DAMPs, HA and uric acid, when in high plasma concentrations may be involved in the systemic inflammatory process by maintaining the activation of the monocytes from women with PE.

Monocyte stimulation with Hsp70 did not induce significantly increase in gene the expression of NLRP1, NLRP3 and caspase-1, suggesting that this DAMP does not activate inflammasomes. Mandrekar *et al.*¹⁷ demonstrated that the induction of oxidative stress in monocytes and macrophages leads to Hsp70 production which regulates the activation of the nuclear transcription factor NF- κ B and the expression of the TNF- α gene. However, our results showed that the stimulation of monocytes with Hsp70 induced increased production of

IL-1 β and TNF- α , suggesting that another pathway of activation may be involved in these inflammatory cytokines production, probably the TLR4 pathway. Human recombinant Hsp70 induces the secretion of proinflammatory cytokines via interaction with the TLR4 receptor.²⁴

Activation of inflammasomes usually requires two signals. The first signal consists of the activation of the TLR receptor pathways resulting in the production of pro-IL-1 β and pro-IL-18, as well as in the increase of transcription and translation of molecules like NLRP3. The second signal is related to the assembly and activation of the inflammasomes that can be activated by a variety of stimuli.⁶⁰ According to Bauernfeind *et al.*⁶¹ the need for this dual stimulation to activate the inflammasomes could be important to prevent the uncontrolled activation of NLRP3, responsible for devastating consequences in the host, as occurs in autoinflammatory diseases. Human peripheral blood monocytes, unlike tissue macrophages, have constitutively activated caspase-1 which is, therefore, able to cleave pro-IL-1 β in biologically active IL-1 β with only one activation signal, such as the interaction of ligands with TLR2 and TLR4 receptors. Thus, IL-1 β production is differently regulated in monocytes and macrophages, reflecting the different functions of these cells in host defense and inflammation, representing an adaptation of each cell to its respective environment.⁶²

The elevated levels of TNF- α in pre-eclamptic women detected in the present study could act in the inflammasome complex by its stimulatory effect on the transcription factor nuclear- κ B. The synthesis of TNF- α as well as IL-1 β is regulated in part by NF- κ B, which is more active in cells of women with PE.¹⁴ This factor regulates transcription of genes related to inflammation^{63,64} and TNF- α , on the other hand, acts by stimulating the activation of NF- κ B, maintaining a cycle of cellular activation.⁶⁵ Although not directly related to the inflammasomes, TNF- α is an important inflammatory cytokine produced in the first sign of activation of this multiprotein complex. A recent study demonstrated that in vitro stimulation with TNF- α induces early expression of NLRP3 mRNA in a 3T3-L1 adipocyte line that is

detected soon after one hour of culture, reaching the maximum concentration after 3 h post-stimulation and suggesting that the gene NLRP3 is an immediate responsive gene to TNF- α . The expression of TNF- α -induced NLRP3 in these cells depends on the ERK pathway, probably in coordination with the NF-kB pathway.⁶⁶ Furthermore, according to Bauernfeind *et al.*,⁶⁷ elevated systemic levels of TNF- α were responsible for increased NLRP3 expression and caspase-1 activity in adipose and liver tissues in elderly mice, suggesting that the NLRP3 inflammatory pathway plays an important role in sterile inflammatory processes.

Monocytes from normotensive pregnant women stimulated with HA and Hsp70 present lower expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-18, TNF- α and HMGB1 in relation to pre-eclamptic and non-pregnant women. This lower expression observed in normotensive pregnant women could be due to the regulation exerted by IL-10 in these cells. The predominance of the IL-10 anti-inflammatory cytokine in normal pregnancy might minimize the deleterious effects of an excessive inflammatory response and is able to regulate the inflammatory response that occurs during pregnancy by controlling the gene expression of IL-1 β and TNF- α . Previous work has shown that monocytes from pre-eclamptic pregnant women produce significantly lower endogenous levels of IL-10 than normotensive pregnant women, whereas TNF- α levels are elevated.^{11,68}

In conclusion, the results of the present study demonstrated that monocytes from women with PE show endogenous activation of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes, and express high levels of IL-1 β , IL-18, HMGB1 and TNF- α . The activation of these inflammasomes was associated with the higher plasma concentration of HA in these pregnant women. The stimulation of monocytes with HA induced increased gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β and HMGB1, as well as the production of IL-1 β was more evident in pre-eclamptic and non-pregnant women. Monocyte stimulated with Hsp70 contributed to the production of IL-1 β and TNF- α by these cells through mechanism

independent of inflammasome activation. These results suggest the participation of these DAMPs in the systemic inflammatory response characteristic of PE. The study of mechanisms involved in the activation of monocytes by DAMPs, whether or not dependent on inflammasomes, in women with PE, will allow a better understanding of this important inflammatory syndrome of pregnancy.

Acknowledgement

This work was supported by the Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil, FAPESP, (Grant No 2012/24697-8 and 2013/00534-5). The authors thank the staff of the hospitals and the women who participated in this study.

Author contributions

MRV, MLM, VRR and PRN performed experiments. VTB and JCP selected pregnant women for the study. JPAJr collaborated in data interpretation, and MRV and MTSP conceived the ideas, designed experiments, analyzed data and prepared the manuscript.

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

References

1. van Rijn BB, Franx A, Steegers EA, de Groot CJ, Bertina RM, Pasterkamp G, *et al.* Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS One* 2008; **3**:e1865.
2. ACOG Practice Bulletin no. 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; **99**:159–67.
3. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; **183**:S1-S22.
4. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, *et al.* The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens* 2014; **4**:97-104.
5. Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet* 2016; **387**:999-1011.
6. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; **180**:499-506.
7. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; **11**:309-16.
8. Peracoli JC, Rudge MVC, Peracoli MTS. Tumor necrosis factor- α in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007; **57**:177-85.
9. Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013; **22**:8-19.
10. Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, *et al.* High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2013; **100**:129-34.

11. Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, *et al.* Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res* 2013; **47**:268-75.
12. Peraçoli MT, Bannwart CF, Cristofalo R, Borges VT, Costa RA, Witkin SS, *et al.* Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol* 2011; **66**:460-7.
13. Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A, *et al.* Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2009; **61**:346-59.
14. Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF-kb pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol* 2012; **95**:67-72.
15. Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, *et al.* Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in pregnant women with preeclampsia. *PLoS One*. 2015; **10**:e0129095.
16. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, *et al.* Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002; **277**:15028-34.
17. Mandrekar P, Catalano D, Jeliaskova V, Kodys K. Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for TNF-alpha regulation. *J Leukoc Biol* 2008; **84**:1335-45.
18. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, *et al.* Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004; **279**:7370-7.
19. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, *et al.* The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; **276**:10229-33.

20. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Nastasi G, Calatroni A. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol* 2010; **80**:480-90.
21. Saïd-Sadier N, Ojcius DM. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J* 2012; **35**:437-49.
22. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 1991; **66**:191-7.
23. Njemini R, Lambert M, Demanet C, Mets T. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Immunol* 2003; **58**:664-9.
24. Lee KH, Jeong J, Yoo CG. Positive feedback regulation of heat shock protein 70 (Hsp70) is mediated through Toll-like receptor 4-PI3K/Akt-glycogen synthase kinase-3 β pathway. *Exp Cell Res* 2013; **319**:88-95.
25. Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol* 2013; **93**:865–73.
26. Bustin M. Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. *Mol Cell Biol* 1999; **19**:5237-46.
27. Holmlund U, Wähämaa H, Bachmayer N, Bremme K, Sverremark-Ekström E, Palmblad K. The novel inflammatory cytokine high mobility group box protein 1 (HMGB1) is expressed by human term placenta. *Immunology* 2007; **122**:430-7.
28. Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 2004; **255**:320-31.
29. Chen Q, Yin YX, Wei J, Tong M, Shen F, Zhao M, *et al.* Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) in the cytoplasm of placental syncytiotrophoblast from preeclamptic placentae. *Cytokine* 2016; **85**:30-6.
30. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, Wewers MD, *et al.* Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol* 2010; **185**:4385-92.

31. Naruse K, Sado T, Noguchi T, Tsunemi T, Yoshida S, Akasaka J, *et al.* Peripheral RAGE (receptor for advance glycation endproducts)-ligands in normal pregnancy and preeclampsia: novel markers of inflammatory response. *J Reprod Immunol* 2012; **93**:69-74.
32. Zhu L, Zhang Z, Zhang L, Shi Y, Qi J, Chang A, *et al.* HMGB1-RAGE signaling pathway in severe preeclampsia. *Placenta* 2015; **36**:1148-52.
33. Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, *et al.* NLRP3/Cryopyrin Is Necessary for Interleukin-1 β (IL-1 β) Release in Response to Hyaluronan, an Endogenous Trigger of Inflammation in Response to Injury. *J Biol Chem* 2009; **284**:12762–12771.
34. Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* 2004; **279**:17079-84.
35. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 2006; **85**:699-715.
36. Berg S, Engman A, Holmgren S, Lundahl T, Laurent TC. Increased plasma hyaluronan in severe pre-eclampsia and eclampsia. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; **61**:131-7.
37. Romão M, Weel IC, Lifshitz SJ, Peraçoli MT, Witkin SS. Elevated hyaluronan and extracellular matrix metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2014; **289**:575-9.
38. Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, *et al.* Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol* 2005; **193**:921-7.
39. Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstetter A, Agostini A, Capelle M, *et al.* Preeclampsia: impaired inflammatory response mediated by Toll-like receptors. *J Reprod Immunol* 2008; **78**:80-3.
40. Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci* 2008; **15**:231-42.
41. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; **296**:301-5.

42. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**:707-35.
43. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012; **481**:278-86.
44. Eder C. Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology* 2009; **214**:543-53.
45. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; **10**:241-7.
46. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; **464**:1357-61.
47. Grishman EK, White PC, Savani RC. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 β in the development and progression of type 1 diabetes. *Pediatr Res* 2012; **71**:626-32.
48. Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res* 2011; **4**:39-49.
49. Yang CS, Shin DM, Jo EK. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *Int Neurol J* 2012; **16**:2-12.
50. Li CY, Lam KW, Yam LT. Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1973; **21**:1-12.
51. Larionov, A., Krause, A., Miller, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinform* 2005; **6**:62.
52. Iversen A. Inflammatory mechanisms in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens* 2013; **3**:58.
53. Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S, Redman CW. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2003; **59**:153-60.
54. Khan RN, Hay DP. A clear and present danger: inflammasomes DAMPING down disorders of pregnancy. *Hum Reprod Update* 2015; **21**:388-405.

55. Weel IC, Romao-Veiga M, Matias ML, Fioratti EG, Peraçoli JC, Borges VT, *et al.* Inflammasome activation in placenta from pregnant women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens* 2016; **6**:189-90.
56. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; **440**:228–32
57. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; **140**:821-32.
58. Pontillo A, Reis EC, Bricher PN, Vianna P, Diniz S, Fernandes KS, *et al.* NLRP1 L155H Polymorphism is a Risk Factor for Preeclampsia Development. *Am J Reprod Immunol* 2015; **73**:577-81.
59. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, *et al.* Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* 2009; **187**:61–70.
60. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; **440**:237–41.
61. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, *et al.* Cuttingedge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; **183**:787-91.
62. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009; **113**:2324-35.
63. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, *et al.* Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin-6 and interleukin-8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**:10193-7.
64. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Liu XD, Brabcova I, Sekerkova A, *et al.* Epithelial cells modulate genes associated with NF kappa B activation in co-cultured human macrophages. *Immunobiology* 2011; **216**:1110-6.

65. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**:693-733.
66. Furuoka M, Ozaki KI, Sadatomi D, Mamiya S, Yonezawa T, Tanimura S, *et al.* TNF- α induces caspase-1 activation independently of simultaneously induced NLRP3 in 3T3-L1 cells. *J Cell Physiol* 2016; **231**: 2761-7.
67. Bauernfeind F, Niepmann S, Knolle PA, Hornung V. Aging-Associated TNF production Primes Inflammasome Activation and NLRP3-Related Metabolic Disturbances. *J Immunol* 2016; **197**:2900-8.
68. Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2005; **54**:30-7.

Figure Legends

Figure 1: Gene expression of NLRP1 (A), NLRP3 (B) and caspase-1 (C) in monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT), and non-pregnant women (NP), stimulated or not with Hyaluronan (HA). Expression of caspase-1 (D) in monocytes from non-pregnant women cultured with 50 μ M or 200 μ M of glybenclamide and stimulated or not with HA. * $p < 0.05$ between groups HA^- ; + $p < 0.05$ between groups HA^+ ; # $p < 0.05$ between HA^- and HA^+ ; • $p < 0.05$ between groups (Kruskal-Wallis test).

Figure 2: Gene expression of IL-1 β (A), IL-18 (B), HMGB1 (D) and TNF- α (E) in monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT), and non-pregnant women (NP), stimulated or not with Hyaluronan (HA). Expression of IL-1 β (C) in monocytes from non-pregnant women cultured with 50 μ M or 200 μ M of glybenclamide and stimulated or not with HA. * $p < 0.05$ between groups HA^- ; + $p < 0.05$ between groups HA^+ ; # $p < 0.05$ between HA^- and HA^+ ; • $p < 0.05$ between groups (Kruskal-Wallis test).

Figure 3: Production of the cytokines IL-1 β (A), IL-18 (B) e TNF- α (C) by monocytes from pregnant women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT), and non-pregnant women (NP), stimulated or not with Hyaluronan (HA). * $p < 0.05$ between groups HA^- ; + $p < 0.05$ between groups HA^+ ; # $p < 0.05$ between HA^- and HA^+ (Kruskal-Wallis test).

Figure 4: Gene expression of NLRP1 (A), NLRP3 (B) and caspase-1 (C) in monocytes from women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT), and non-pregnant

women (NP), stimulated or not with Hsp70. * $p < 0.05$ between groups Hsp70⁻; + $p < 0.05$ between groups Hsp70⁺; # $p < 0.05$ between Hsp70⁻ and Hsp70⁺ (Kruskal-Wallis test).

Figure 5: Gene expression of IL-1 β (A), IL-18 (B), HMGB1 (C) and TNF- α (D) in monocytes from women with preeclampsia (PE), normotensive pregnant women (NT) and non-pregnant women (NP), stimulated or not with Hsp70. * $p < 0.05$ between Hsp70⁻ groups; + $p < 0.05$ between Hsp70⁺ groups; # $p < 0.05$ between Hsp70⁻ and Hsp70⁺ (Kruskal-Wallis test).

Figure 6: Production of IL-1 β (A), IL-18 (B) and TNF- α (C) by monocytes from women with preeclampsia (PE), normotensive (NT) and non-pregnant women stimulated or not with Hsp70. * $p < 0.05$ between the Hsp70⁻ groups; + $p < 0.05$ between the Hsp70⁺ groups; # $p < 0.05$ between Hsp70⁻ and Hsp70⁺ (Kruskal-Wallis test).

Table 1: Primers of inflammasomes proteins, cytokines and GAPDH

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	GeneBank
NLRP1	(1728)TCCGGCTCCCATTAGACAGA(1747)	(1810)AGACCCATCCTGGCTCATCT(1791)	NM_033004.3
NLRP3	(2826)GAGGAAAAGGAAGGCCGACA(2845)	(2917)TGGCTGTTACCAATCCATGA(2897)	NM_004895.4
Casp-1	(1065)AGACATCCCACAATGGGCTC(1084)	(1172)TGAAAATCGAACCTTGCGGAAA(1151)	NM_033292.3
HMGB1	(1404)TACGAAAAGGATATTGCTGC(1423)	(1505)CTCCTCTTCCTTCTTTTCTTG(1484)	NM_001313893.1
IL-1β	(544)GAGCAACAAGTGGTGTCTCC(564)	(653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)	NM_000576.2
IL-18	(438)ACTGTAGAGATAATGCACCCCG(459)	(517)AGTTACAGCCATACCTCTAGGC(496)	NM_001562.3
TNF-α	(325)GCTGCACTTTGGAGTGATCG(344)	(462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)	NM_000594.3
GAPDH	(684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703)	(801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	NM_002046.4

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

Characteristics	Pregnant women	Normotensive	Non-pregnant
-----------------	----------------	--------------	--------------

	with preeclampsia (n = 20)	pregnant women (n = 20)	women (n = 20)
Age (years)	25 (15 – 40)	26 (14 – 41)	24 (21 – 40)
Race			
White (%)	82.3	89.3	84.0
Non-white (%)	17.7	10.7	16.0
Gestational age (weeks)	34 (23 – 40)	35 (24 – 39)	–
Parity			
Nulliparous (%)	63	68	–
Multiparous (%)	37	32	–
Systolic Blood Pressure (mmHg)	160 [#] (140 – 200)	110 (90 – 112)	114 (100 – 120)
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	110 [#] (90 – 120)	69 (63 – 70)	70 (65 – 80)
Proteinuria (mg / 24h)	1510* (300 – 18800)	< 300	ND
Uric acid (mg/dL)	5.8 [#] (4.5 – 10.1)	3.8 (2.3 – 4.7)	4.1 (2.6 – 4.8)

Values are expressed in percentage or median, with the minimum and maximum values in parentheses. ND = not determined. * (p <0.05) vs normotensive pregnant women (Mann-Whitney U test); # (p <0.05) vs normotensive pregnant women and non-pregnant women (Kruskal-Wallis test).

Table 3. Concentration of DAMPs in plasma from women with preeclampsia, normotensive pregnant women and non-pregnant women

Parameters	Pregnant women	Normotensive	Non-pregnant
------------	----------------	--------------	--------------

	with preeclampsia (PE)	pregnant women (NT)	women (NP)
Hyaluronan (ng/mL)	135.5 [#] (20.4 – 296.8)	62.4 (2.5 – 199.7)	42.8 (3.3 – 165.0)
Hsp70 (pg/mL)	907.1 [#] (404.63 – 1272.8)	680.23 (7.5 – 1090.4)	655.43 (12.7 – 1083.4)
HMGB1 (ng/mL)	8.11 [#] (1.864 – 97.809)	2.09 (1.682 – 4.789)	2.15 (1.848 – 18.854)

Values are expressed in median, with the minimum and maximum values in parentheses.

(p<0.05) vs normotensive pregnant women and non-pregnant women (Kruskal-Wallis test).

Figure 1

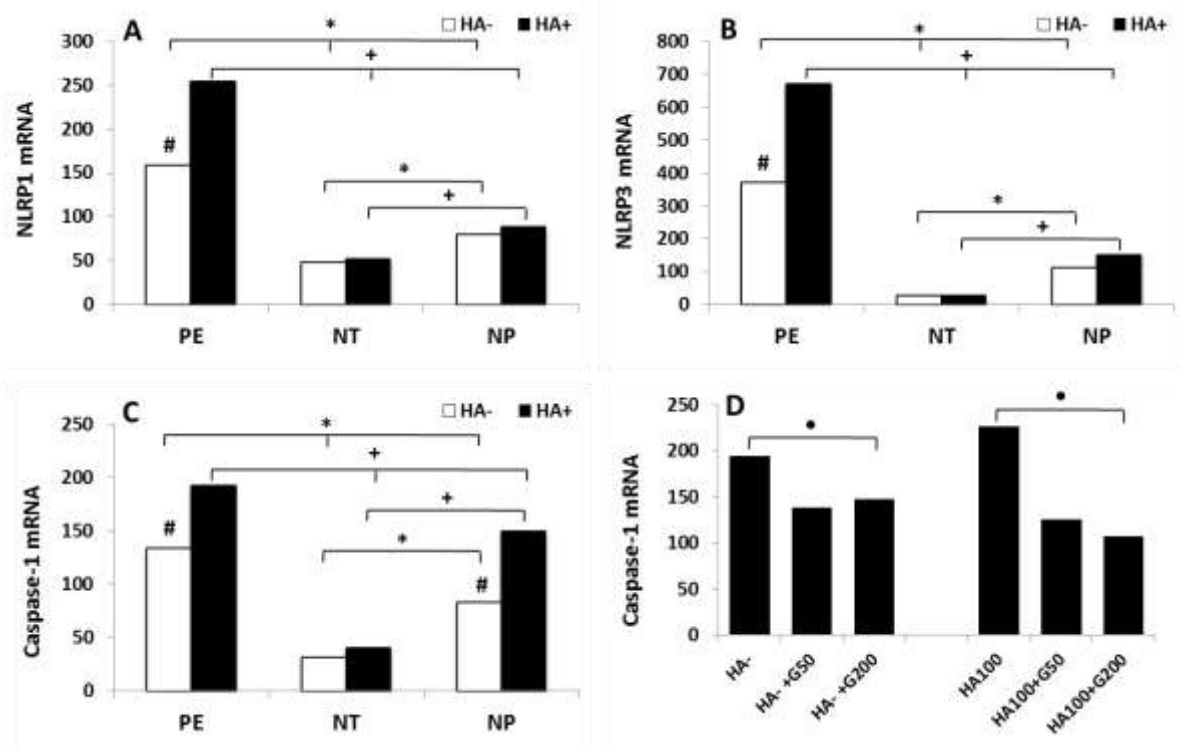


Figure 2

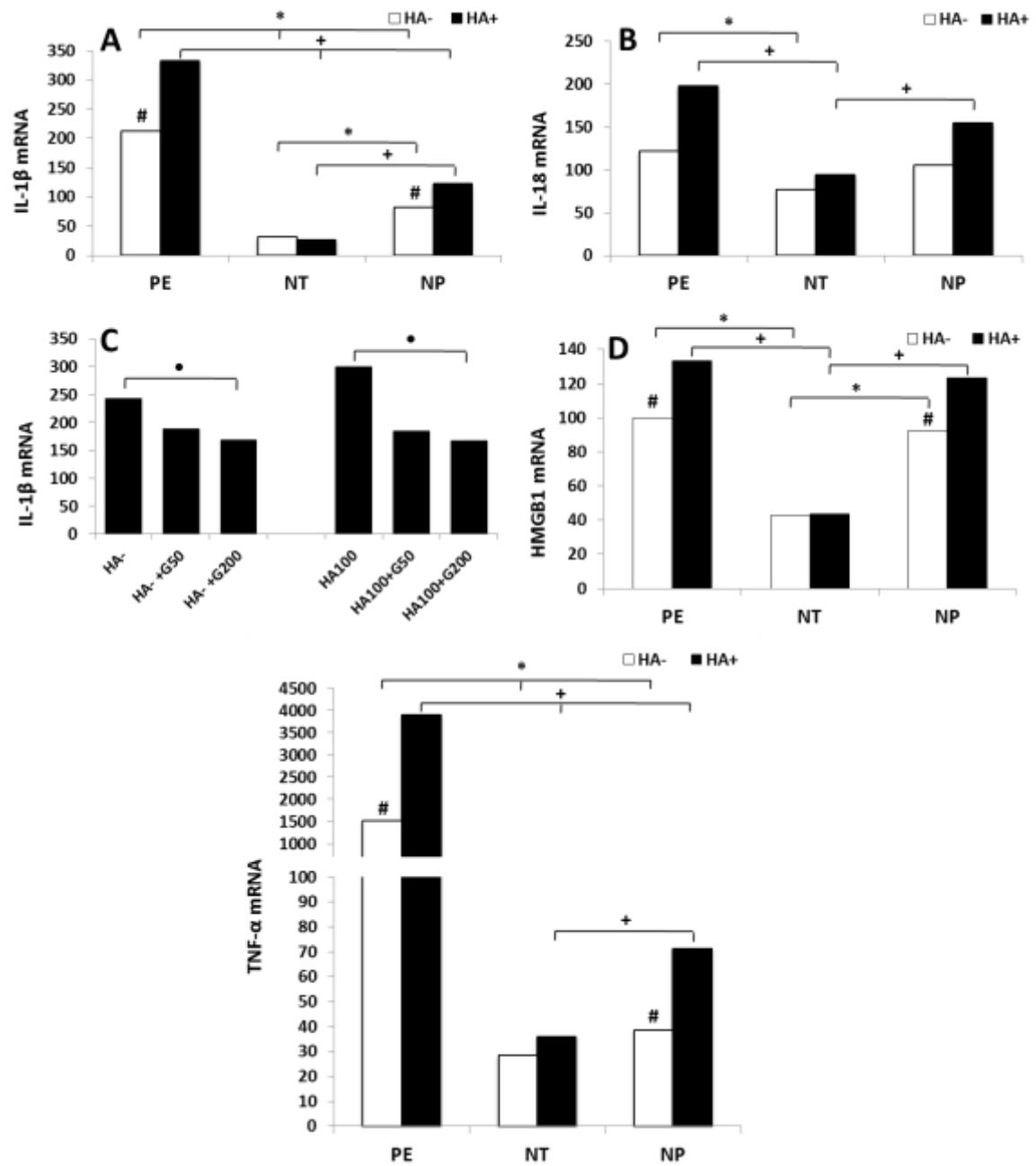


Figure 3

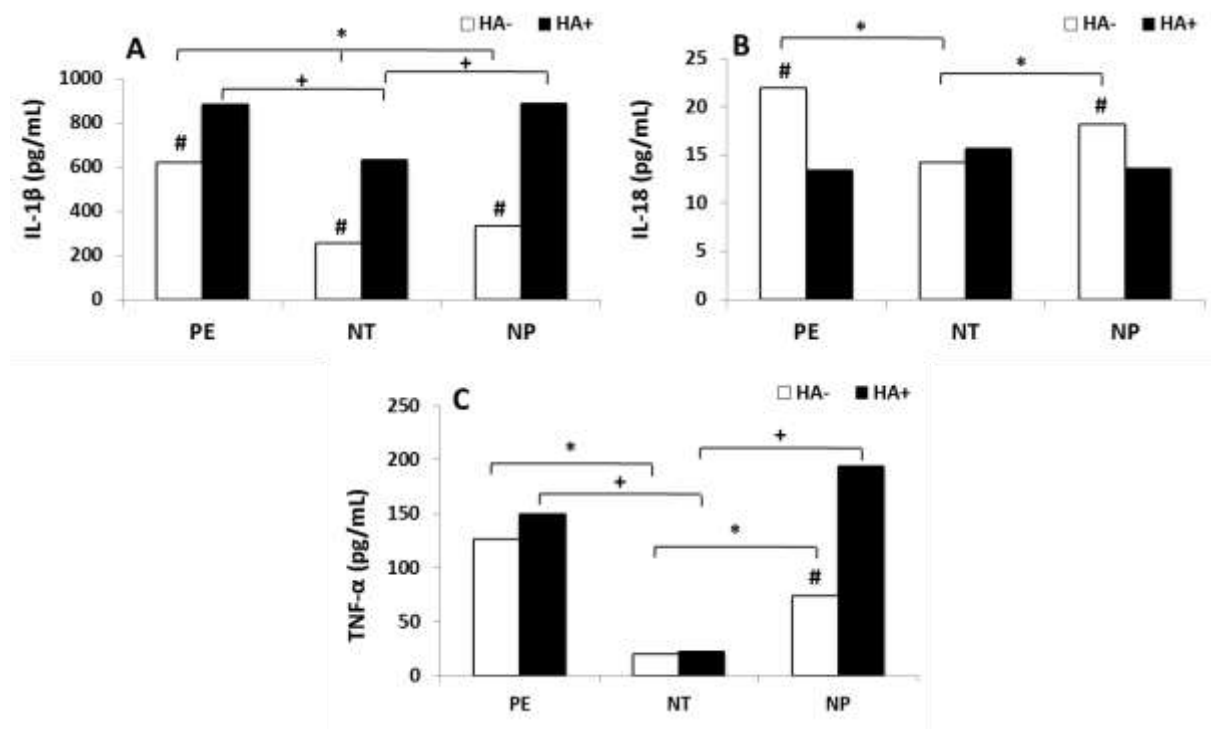


Figure 4

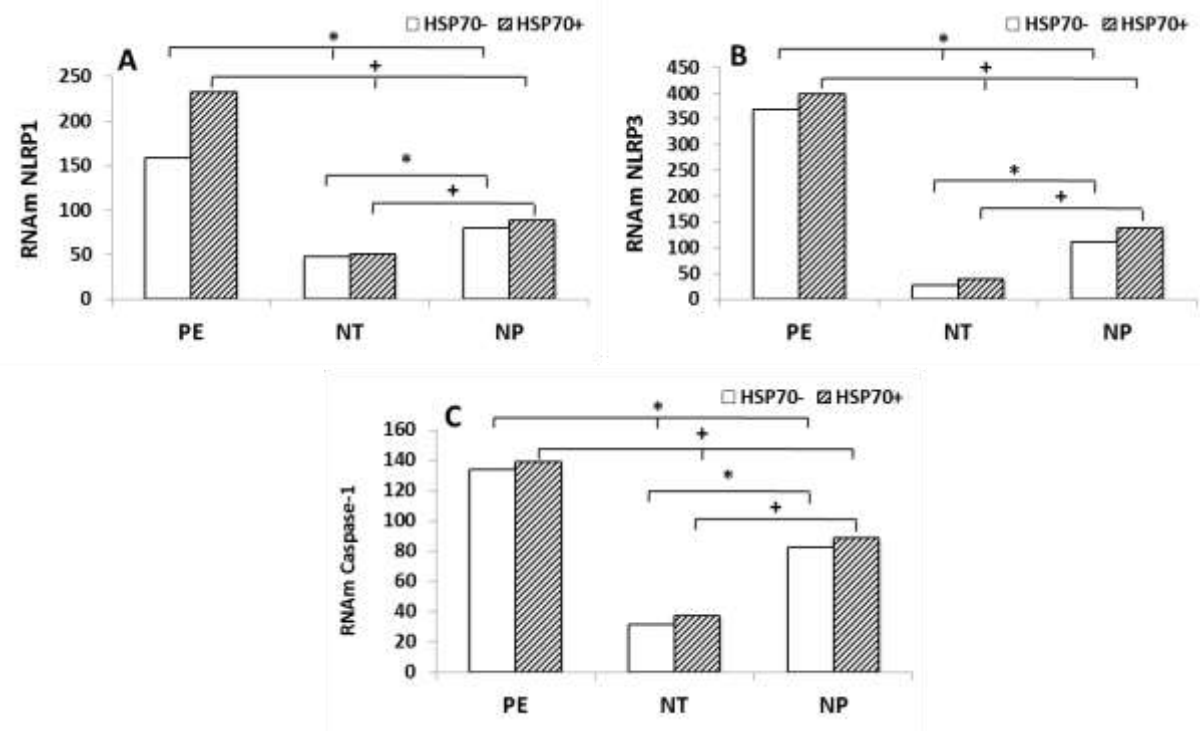


Figure 5

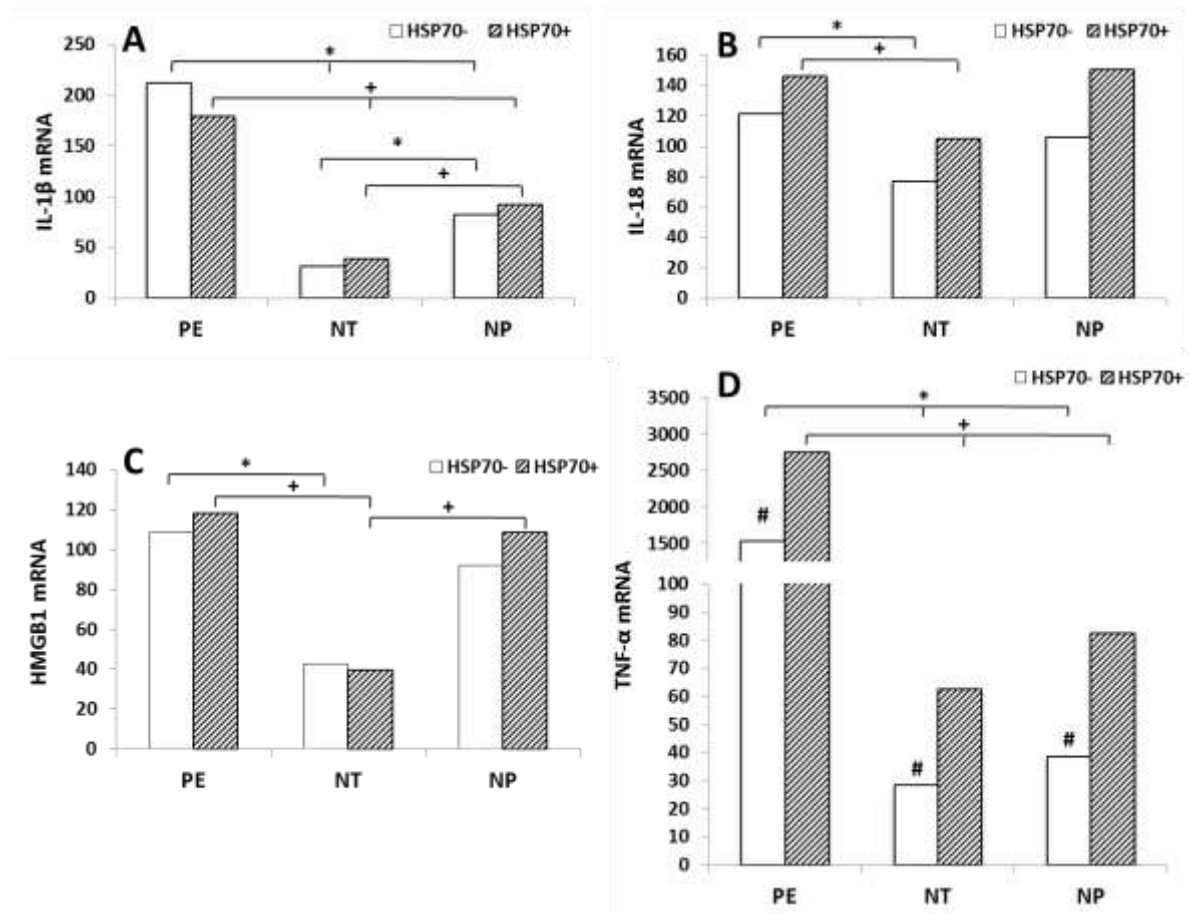
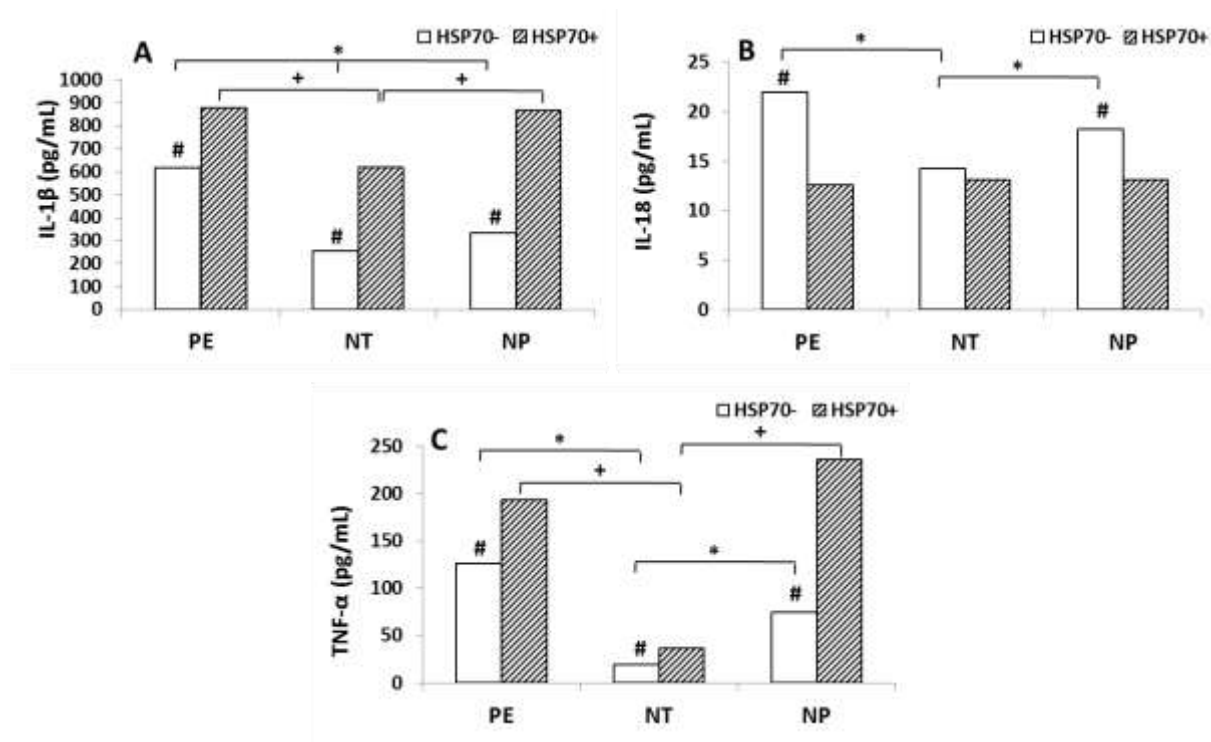


Figure 6



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

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

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

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

Pesquisador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17748313.2.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Microbiologia e Imunologia

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 322.546

Data da Relatoria: 01/07/2013

Apresentação do Projeto:

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

A pré-eclâmpsia (PE) incide entre 3% e 8% das gestações sendo uma das principais causas de morbimortalidade materna e fetal. O estresse oxidativo e a deficiência das defesas antioxidantes são descritos na PE e associam-se com isquemia/hipóxia placentária, lesão endotelial e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no plasma de gestantes portadoras de PE. O subprojeto um tem por objetivo avaliar se ocorre

desbalanço entre ativação do inflamassomo e autofagia em placenta de gestantes pré-eclâmpicas, permitindo melhor compreensão do mecanismo envolvido na disfunção placentária que ocorre na

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 322.546

PE. O subprojeto dois pretende avaliar se ocorre ativação endógena do complexo inflamassomo NLRP3 em monócitos de gestantes com PE e o mecanismo de ativação desse complexo, induzido por estímulo com estruturas moleculares relacionadas ao estresse oxidativo. Analisar a influência da ativação do inflamassomo sobre o desenvolvimento da imunidade adaptativa nessas gestantes pela avaliação das subpopulações de linfócitos TCD4+ e o perfil de citocinas produzido por essas células. O subprojeto três visa avaliar a presença de ativação do complexo inflamassomo NLRP3 nessas células em gestantes portadoras de PE. O conhecimento das vias do inflamassomo nos monócitos poderá trazer melhor compreensão do envolvimento da imunidade inata na fisiopatologia da PE.

Objetivo da Pesquisa:

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

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

Subprojeto 3: a) Avaliar o estado de ativação, endógena e induzida por urato monossódico, de monócitos em gestantes portadoras de PE pela presença de inflamassomo NLRP1/NLRP3 e sua

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 322.546

associação com a produção de IL-1b, TNF-a e IL- 18 por essas células; b)Correlacionar a concentração plasmática de ácido úrico com a ativação do inflamassomo e produção de citocinas inflamatórias por monócitos de gestantes com PE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

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

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

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

Critério de Inclusão:

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

Subprojeto 2 e 3: Gestantes: Ter gestação única, IG entre 28 e 40 semanas com pré-natal e parto no Serviço de Obstetria do HC FMB UNESP.

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

Critério de Exclusão:

Subprojeto 1, 2 e 3: Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de PE tais como: gestação gemelar, pré-eclâmpsia anterior, hipertensão crônica, diabetes, doenças renais, má-formação fetal, doenças infecciosas, soropositividade para HIV e uso de drogas e álcool ou não ter a gestação resolvida na Maternidade do HC FMB-UNESP.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 322.546

Metodologia de análise dos dados adequada (vide projeto).

Número total de sujeitos: 169 sendo 43 mulheres não grávidas (coleta de sangue); 63 com PE (coleta de sangue e/ou placenta); 63 gestantes normotensas (sangue e/ou placenta).

Orçamento: 366.633.85 (FAPESP).

TCLE: elaborado apenas para as gestantes, em forma de convite, sem explicação sobre a doença e sobre o objetivo da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta os seguintes termos:

- Projetos originais
- TCLE apenas para as gestantes com e sem PE (mesmo TCLE)
- Autorização do superintendente do HC
- Folha de rosto (inscrição proponente IB)
- Termo de compromisso de cumprimento da resolução 196/96
- Declaração de relatório final e cronograma de execução
- Declaração de autorização do Chefe de depto da Micro/Imuno
- Declaração de autorização do Chefe de depto da GO

Recomendações:

Sugiro:

- TCLE das gestantes: explicar qual é a doença e o objetivo do estudo, e se a gestante não apresentar a doença qual a o objetivo da sua inclusão
- elaboração de um termo de consentimento para as não grávidas
- Esclarecimento com relação ao número de sujeitos: se as mesmas mulheres serão utilizadas em todos os 3 subprojetos, já que são complementares, aí o número seria de 23 gestantes saudáveis, 23 com PE e 23 não grávidas ou se realmente são 169 como colocado no projeto da PB (43 não grávidas, 63 com PE e 63 gestantes normotensas)
- Autorização do responsável pelo Hemocentro.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 322.546

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendente

- adequar o TCLE das gestantes (com e sem Pré-eclâmpsia)
- elaborar TCLE para as não grávidas, voluntárias do Banco de SAngue, de acordo com o protocolo do Banco de Sangue.
- esclarecimentos quanto ao tamanho amostral;
- autorização do responsável

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Caso Vossa Senhoria atenda às pendências até o dia 08/07/2013, será possível a realização de revisão de seu processo em reunião extraordinária do CEP que acontecerá em 19/07/2013.

BOTUCATU, 02 de Julho de 2013

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

ANEXO 3 – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

“ENVOLVIMENTO DE INFLAMASSOMO E AUTOFAGIA NA FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPsia”

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

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

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

Eu, _____, gestante, atendida no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, fui convidada a participar da pesquisa para compor a lista de pacientes com pré-eclâmpsia. O objetivo desta pesquisa é o de entender como a pré-eclâmpsia atua no organismo das gestantes. Fui solicitada a doar pequena quantidade de sangue da veia do braço (10 mL), que será colhido com seringa e agulha descartável, uma única vez, no momento em que for atendida pelo médico e/ou será colhido um pedaço da placenta depois do parto. O convite para participar da pesquisa será feito na ausência de dor ou de qualquer sintoma que dificulte meu entendimento. Estou ciente de que a doação desse volume de sangue não me causará dor, a não ser a da picada da agulha no momento da coleta do sangue e, raramente, a formação de um pequeno hematoma no local. Fui informada que não terei benefícios diretos com a pesquisa, mas que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo. Fui informada também que eu posso, a qualquer momento, esclarecer dúvidas e desistir de participar da pesquisa, sem prejuízo do atendimento médico que necessitar e, que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados. Estou ciente de que, caso eu seja menor de idade, este termo de consentimento deverá ser assinado por mim e pelo meu responsável.

Assim, concordo em participar da pesquisa.

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

Botucatu, ____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário maior de 18 anos

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

Assinatura da adolescente maior de 11 anos

Pesquisadores:

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

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

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

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

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

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

“ENVOLVIMENTO DE INFLAMASSOMO E AUTOFAGIA NA FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPsia”

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

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

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

Eu, _____, gestante, atendida na Unidade de Saúde da Família – Jardim Iolanda, fui convidada a participar da pesquisa para compor a lista de pacientes como grupo controle, por não possuir doença. O objetivo desta pesquisa é o de entender como a pré-eclâmpsia atua no organismo das gestantes, para isso é necessário entender como se desenvolve a gestação sem essa doença. Fui solicitada a doar pequena quantidade de sangue da veia do braço (10 mL), que será colhido com seringa e agulha descartável, uma única vez, no momento em que for atendida pelo médico e/ou será colhido um pedaço da placenta depois do parto. O convite para participar da pesquisa será feito na ausência de dor ou de qualquer sintoma que dificulte meu entendimento. Estou ciente de que a doação desse volume de sangue não me causará dor, a não ser a da picada da agulha no momento da coleta do sangue e, raramente, a formação de um pequeno hematoma no local. Fui informada que não terei benefícios diretos com a pesquisa, mas que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo. Fui informada também que eu posso, a qualquer momento, esclarecer dúvidas e desistir de participar da pesquisa, sem prejuízo do atendimento médico que necessitar e, que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados. Estou ciente de que, caso eu seja menor de idade, este termo de consentimento deverá ser assinado por mim e pelo meu responsável.

Assim, concordo em participar da pesquisa.

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

Botucatu, ____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário maior de 18 anos

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

Assinatura da adolescente maior de 11 anos

Pesquisadores:

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

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

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

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

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

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

“ENVOLVIMENTO DE INFLAMASSOMO E AUTOFAGIA NA FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPsia”

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

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

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

Eu, _____, doadora de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, fui convidada a participar da pesquisa para como grupo controle, por não possuir doença. O objetivo desta pesquisa é o de entender como a pré-eclâmpsia atua no organismo das gestantes. Para isso é necessário entender como se desenvolve a gestação sem essa doença e como é a resposta do organismo de mulheres não grávidas. Nesta pesquisa, fui solicitada a doar pequena quantidade de sangue da veia do braço (10 mL), que será colhido com seringa e agulha descartável, uma única vez, no momento em que for atendida. Estou ciente de que a doação desse volume de sangue não me causará dor, a não ser a da picada da agulha no momento da coleta do sangue e, raramente, a formação de um pequeno hematoma no local. Fui informada que não terei benefícios diretos com a pesquisa, mas que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo. Fui informada também que eu posso, a qualquer momento, esclarecer dúvidas e desistir de participar da pesquisa, sem prejuízo do atendimento médico que necessitar e, que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados.

Assim, concordo em participar da pesquisa.

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

Botucatu, ____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador

Pesquisadores:

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

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

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

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

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