



MARIANA ROMÃO

**DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS E DE
BIOMARCADORES CELULARES EM GESTANTES
PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPSIA**

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

MESTRADO

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

UNESP

2013

MARIANA ROMÃO

**DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS E DE
BIOMARCADORES CELULARES EM GESTANTES PORTADORAS
DE PRÉ-ECLÂMPSIA**

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

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Co-Orientador: José Carlos Peraçoli

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

UNESP

2013

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

Romão, Mariana.

Determinação da ativação de monócitos e de biomarcadores celulares em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Mariana Romão. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

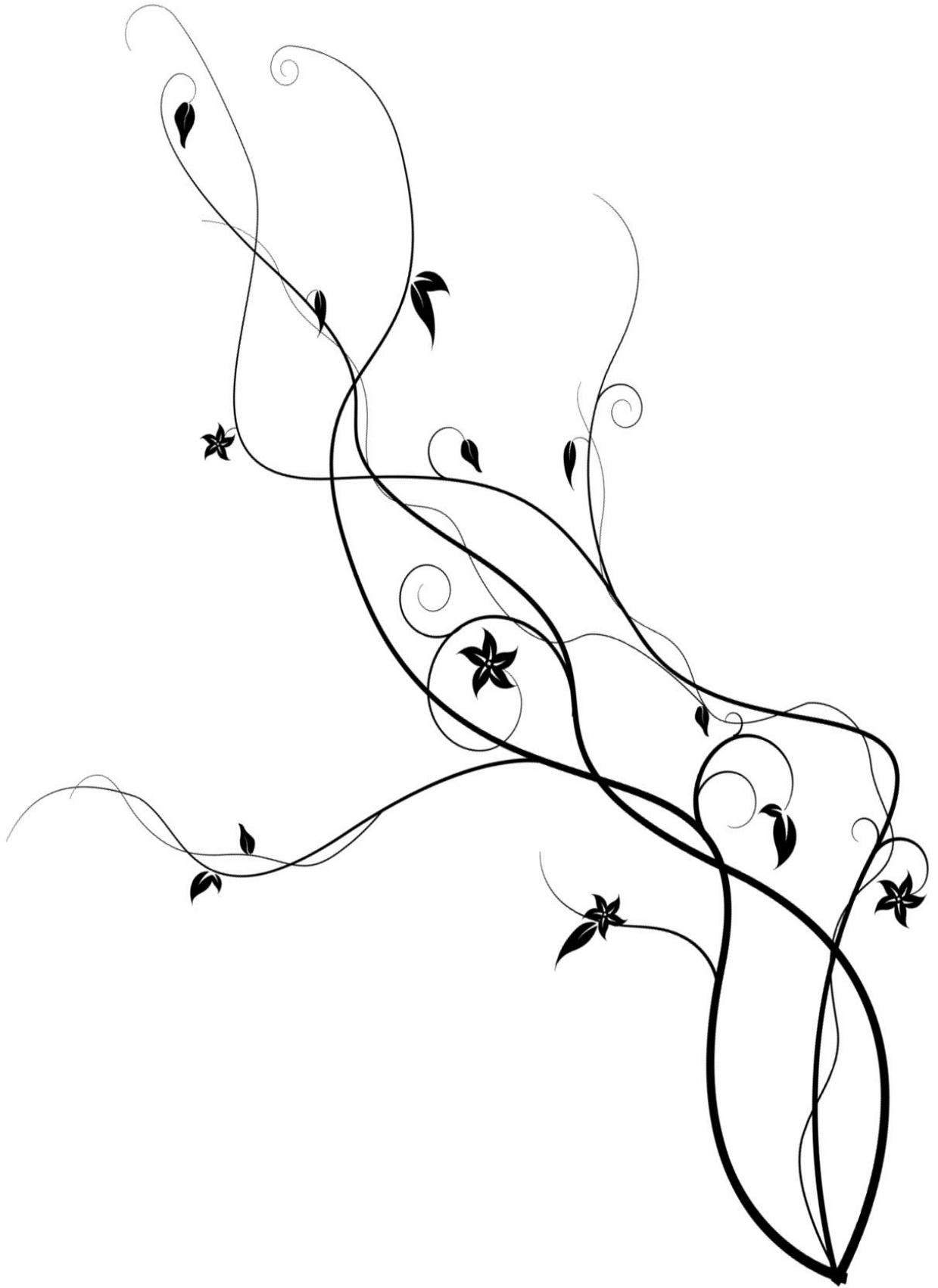
Coorientador: José Carlos Peraçoli

Capes: 21104000

1. Monócitos. 3. Citocinas. 3. Pré-eclâmpsia. 4. Gravidez - Complicações.

Palavras-chave: Citocinas; Biomarcadores celulares; NF- κ B; Pré-eclâmpsia; TLR.

Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências - UNESP-Botucatu e no laboratório de Immunology and Microbiology Testing Unit da Weill Cornell Medical College - NY, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
Processos nº 2010/12893-1, 2010/20207-0 e 2012/08477-8.



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.

"Que a família comece e termine sabendo aonde vai
E que o homem carregue nos ombros a graça de um pai
Que a mulher seja um céu de ternura, aconchego e calor
E que os filhos conheçam a força que brota do amor!" (Pe. Zezinho)

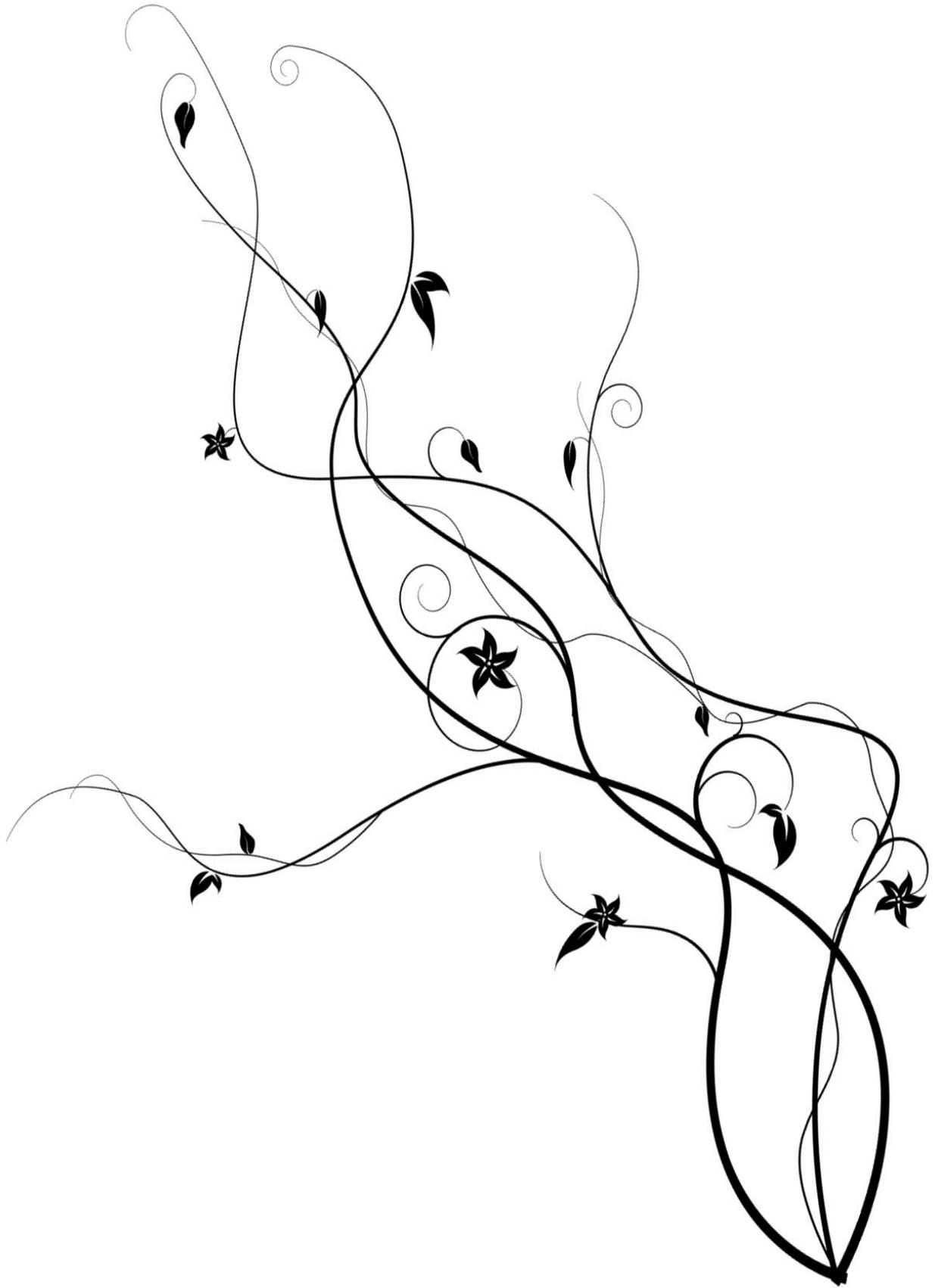
Aos meus pais, José Carlos e Helena, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la e que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, me fazendo acreditar que nada é impossível.

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

Aos meus sobrinhos, Natália, Murilo e João Pedro que só fazem alegrar a minha vida!

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

À toda minha família, Vô Pedro, Vó Loudes, Renata, Tia Lúcia, Tio Wilson, a todos tios, tias, primos e primas, obrigada por serem meu porto seguro, obrigada por sempre me incentivarem a ir mais longe e obrigada, 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 e ao meu co-orientador José Carlos Peraçoli, por todo empenho, sabedoria, compreensão e ajuda, por serem exemplos, profissional e pessoal, de humildade e idoneidade. Meu muito obrigada pelo carinho, amizade e dedicação em todos esses anos de trabalho e convívio.

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

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

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

Às minhas grandes amigas Ingrid e Juliana, por fazerem parte de minha vida, amizade a gente não escolhe, ela surge naturalmente!

Aos amigos, Fernanda (Felícia), Rafael (Banana), Bruno, Adriana, Daniel (Lello), Juliana, Marcelo (Bolinha), Liv, Fuzita, Pâmela, Luiz e Eduardo que tornaram meus dias muito mais alegres.

Aos meus amigos do LAB 3, Camila, Vanessa, Mariana, Thais, Célio, e Priscila pela ajuda, ensinamentos, amizade, erros e risadas, obrigada por produzirem um ambiente de trabalho tão divertido e agradável.

Ao prof. Steven Sol Witkin, pela oportunidade de realizar um projeto em seu laboratório de Immunology and Microbiology Testing Unit da Weill Cornell Medical College – NY.

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

A todos docentes e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por toda a ajuda.

Aos funcionários do Hemocentro de Botucatu – UNESP, pela utilização do citômetro de fluxo, em especial à Marjorie A. Golim, pela leitura e análise das amostras.

Às enfermeiras do ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia, 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 Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, 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 2010/12893-1, 2010/20207-0 e 2012/08477-8.

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

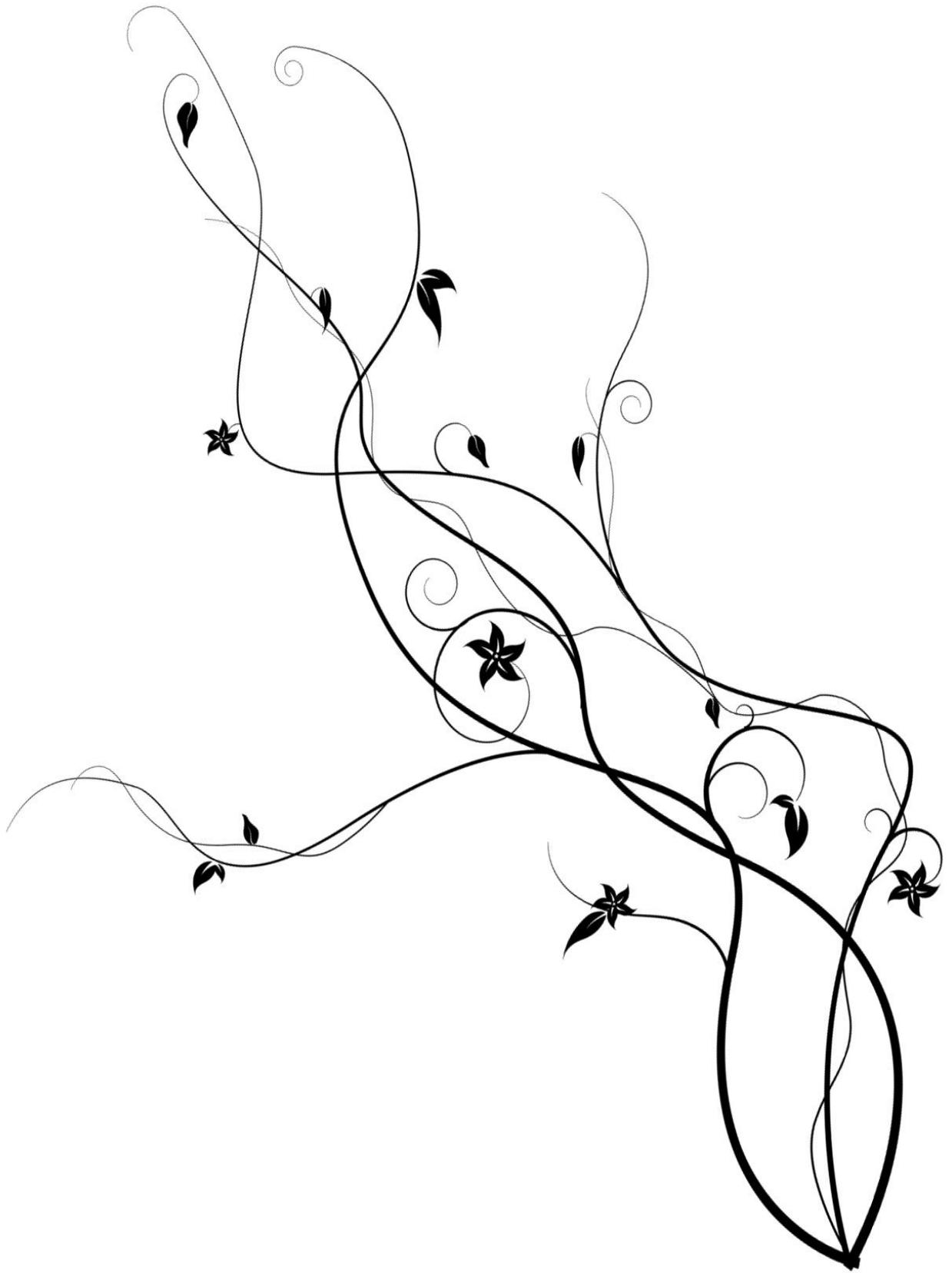
Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
3. SUJEITOS E MÉTODOS	24
3.1. Sujeitos	24
3.2. Critérios de inclusão	25
3.3. Critérios de exclusão.....	25
3.4. Dosagem da proteinúria	25
3.5. Colheita de sangue	25
3.6. Isolamento e cultura de monócitos.....	25
3.7. Expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de monócitos	26
3.8. Extração nuclear de células mononucleares	27
3.11. Obtenção de sobrenadante de cultura de monócitos	28
3.12. Determinação das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12.....	28
3.13. Análise Estatística	29
4. RESULTADOS	29
4.1. Características dos grupos estudados	29
4.2. Expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de monócitos	31
4.3. Determinação de NF- κ B em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e normotensas	33
4.4. Produção de citocinas por monócitos de gestantes portadoras de pré- eclâmpsia e normotensas.....	34
4.4.1. Produção de TNF- α e IL-10	34

4.4.2. Produção de IL-12p40 e IL-12p70	36
5. DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO II.....	52
RESUMO	54
ABSTRACT	55
1. INTRODUÇÃO	56
2. OBJETIVOS.....	59
3. SUJEITOS E MÉTODOS	59
3.1. Sujeitos	59
3.2. Critérios de inclusão.....	59
3.3. Critérios de exclusão.....	60
3.4. Colheita de sangue	60
3.5. Determinação EMMPRIN, visfatina e hialuronan	60
3.6. Determinação de gelsolina e histona H2B	61
3.7. Análise Estatística.....	62
4. RESULTADOS.....	62
4.1. Características dos grupos estudados	62
4.2. Concentração de biomarcadores celulares no plasma de gestantes NT e gestantes com PE.....	63
4.3. Avaliação de gelsolina no plasma	64
4.4. Concentração de biomarcadores celulares plasmáticos de gestantes normotensas e de gestantes com PE, classificadas em PE Leve e PE Grave.....	65
5. DISCUSSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS	76



CAPÍTULO I

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES TLR2 E TLR4,
FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NF-KB E PRODUÇÃO DE IL-10,
IL-12 E TNF-ALFA POR MONÓCITOS DE GESTANTES PORTADORAS
DE PRÉ-ECLÂMPسيا**

**Association between TLR2 and TLR4 receptors expression, nuclear transcription
factor NF-KB activation and IL-10, IL-12 and TNF-alpha production by monocytes
from pregnant women with preeclampsia**

Mariana Romão¹; Camila Ferreira Bannwart-Castro¹; Ingrid Cristina Weel¹; Vera
Therezinha Medeiros Borges¹; Marjorie Assis Golim²; José Carlos Peraçoli¹; Maria
Terezinha Serrão Peraçoli³

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

² Divisão Hemocentro - Faculdade de Medicina- UNESP- Universidade Estadual
Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, CEP 18618-970.

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

RESUMO

Introdução: A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação humana, caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica, de maior intensidade do que a observada na gestação normal. Nessa patologia, células do sistema imune inato como monócitos e granulócitos encontram-se ativadas endogenamente e secretam níveis elevados de radicais livres e citocinas inflamatórias. **Objetivos:** 1) Determinar o estado de ativação endógena de monócitos pela expressão de receptores TLR2 e TLR4, bem como a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B nessas células em gestantes portadoras de PE distribuídas quanto à idade gestacional de aparecimento das manifestações clínicas (precoce ou tardia) da doença; 2) Correlacionar a expressão de TLR2 e TLR4 com a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-10 (IL-10) e IL-12 por monócitos estimulados com lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS) e peptidoglicano (PGN) de bactéria Gram-positiva em gestantes com PE precoce ou tardia; 3) Verificar se os parâmetros estudados diferenciam PE precoce e tardia. **Métodos:** Foram estudadas 92 gestantes, sendo 32 normotensas e 60 portadoras de PE, pareadas pela idade gestacional. As gestantes pré-eclâmpicas foram classificadas de acordo com o aparecimento das manifestações clínicas em PE precoce (<34 semanas de gestação, n=30) e PE tardia (\geq 34 semanas de gestação, n=30). Monócitos de sangue periférico obtidos de gestantes normotensas ou com PE foram cultivados por 18 h na ausência ou presença de LPS ou de PGN. A expressão de receptores TLR2 e TLR4, presentes na superfície de monócitos, foi detectada por citometria de fluxo, empregando-se anticorpos monoclonais específicos, marcados com fluorocromos. Para análise da ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B os monócitos foram incubados na presença ou ausência de LPS ou PGN por 30 min e o extrato nuclear obtido foi empregado para dosagem de NF- κ B. Monócitos foram ainda cultivados na presença ou ausência de LPS e PGN e o sobrenadante obtido após 18 h de cultivo foi aspirado e empregado para dosagem das citocinas TNF- α , IL-10, IL-12p40 e IL-12p70, pela técnica de ELISA. Os resultados foram analisados por testes não paramétricos, com nível de significância de 5%. **Resultados:** A expressão endógena de TLR4 em monócitos de gestantes com PE foi significativamente maior em relação às gestantes normotensas e

significativamente diferente entre os grupos de PE precoce e tardia. Foi observada maior ativação endógena de NF-κB em gestantes com PE quando comparadas com gestantes normotensas, porém não houve diferença entre os grupos com PE precoce e tardia. Quando estimulados com LPS e PGN os monócitos das gestantes com PE apresentaram menor ativação de NF-κB em comparação às gestantes normotensas. A produção endógena de TNF-α, IL-12p40 e IL-12p70 por monócitos de gestantes com PE em comparação às normotensas foi significativamente mais elevada, enquanto a síntese de IL-10 foi estatisticamente menor. A análise da concentração de IL-10 e IL-12 mostrou diferença estatística entre os grupos de PE precoce e tardia. Após estímulo com LPS e PGN observou-se produção elevada de IL-12p40 e IL-12p70 nos quatro grupos de gestantes, sendo os níveis produzidos pelas células das gestantes com PE significativamente maiores. Ao contrário, a liberação de IL-10 e TNF-α por monócitos das gestantes pré-eclâmpicas, quando estimulados, foi significativamente reduzida em comparação às gestantes normotensas, sugerindo tolerância ao estímulo in vitro com LPS e PGN. **Conclusão:** Os resultados confirmam o estado de ativação dos monócitos em gestantes portadoras de PE pela maior expressão de receptores TLR4, ativação de NF-κB e produção aumentada de citocinas inflamatórias. Entre esses parâmetros, a expressão de TLR4 e a produção de IL-10 e IL-12 permitiram diferenciar PE precoce e tardia.

Palavras chave: pré-eclâmpsia, monócitos, receptores TLR, NF-κB, citocinas.

ABSTRACT

Introduction: Preeclampsia (PE) is a pregnancy-specific human syndrome characterized by a systemic inflammatory response, with higher intensity than the one observed in normal pregnancy. In this pathology, innate immune cells such as monocytes and granulocytes are activated endogenously and secrete high levels of inflammatory cytokines and free radicals. **Objectives:** 1) to determine the activation state of monocytes by endogenous expression of TLR2 and TLR4 receptors as well as the nuclear transcription factor (NF- κ B) activation in these cells in pregnant women with PE, distributed according to the gestational age of clinical manifestations (early or late-onset) of the disease; 2) to correlate TLR2 and TLR4 expression with TNF- α , IL-10 and IL-12 by monocytes stimulated with lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* and peptidoglycan (PGN) of Gram-positive bacteria in pregnant women with early-onset or late-onset PE; 3) to verify if the parameters studied may differentiate early-onset or late-onset PE. **Methods:** We studied 92 pregnant women, 32 normotensive and 60 women with PE, paired for gestational age. Preeclamptic pregnant women were classified according to onset of clinical manifestations in early-onset PE (<34 weeks gestation, n=30) and late-onset PE (\geq 34 weeks gestation, n=30). Monocytes from peripheral blood obtained from preeclamptic and normotensive pregnant women were incubated for 18h in the absence or presence of LPS or PGN. Expression of TLR2 and TLR4 receptors present on the surface of monocytes, was detected by flow cytometry, using specific monoclonal antibodies labeled with fluorochromes. To analyze NF- κ B, monocytes were incubated with or without LPS or PGN for 30 min and the nuclear extract obtained was employed for NF- κ B determination. Monocytes were further cultured in the presence or absence of LPS and PGN and the supernatant obtained after 18h cultivation was aspirated and used for TNF- α , IL-10, IL-12p40 and IL-12p70 determination by ELISA. The results were analyzed by nonparametric tests, with a significance level of 5%. **Results:** The endogenous expression of TLR4 in monocytes from pregnant women with PE was significantly higher than in normotensive, and significantly different between groups of early and late-onset PE. We observed higher endogenous NF- κ B activation in patients with PE compared with normotensive pregnant women, but no significant difference between early and late-onset PE groups was detected. Lower activation

of NF- κ B was seen when monocytes of preeclamptic pregnant women were stimulated with LPS and PGN. The endogenous production of TNF- α , IL-12p40 and IL-12p70 by monocytes was significantly higher, whereas the synthesis of IL-10 was lower in pregnant women with PE compared to normotensive pregnant women. IL-10 and IL-12 concentrations were significantly different between groups of early and late-onset PE. After LPS and PGN stimulation high production of IL-12p40 and IL-12p70 was detected in the four groups of pregnant women, but the levels produced by the cells of pregnant women with PE were significantly higher. However TNF- α release by monocytes of preeclamptic pregnant women, after stimulation, was significantly reduced when compared to normotensive pregnant women, suggesting in vitro tolerance to LPS and PGN stimulation. **Conclusion:** The results confirm the activation state of monocytes in pregnant women with PE by high expression of TLR4 receptors, NF- κ B activation and increased production of inflammatory cytokines by these cells. Among these parameters, TLR4 expression as well as IL-10 and IL-12 production may differentiate early- and late-onset preeclampsia.

Keywords: preeclampsia, monocytes, TLR receptors, NF- κ B, cytokines.

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez humana que incide entre 3% e 8% das gestações (Carty et al., 2010; Uzan et al., 2011), sendo considerada a principal causa de morbidade e mortalidade materna e perinatal, especialmente nos países em desenvolvimento (Sibai et al., 2005; Duley, 2009). É uma doença sistêmica, caracterizada por múltiplas alterações no organismo materno (Wegmann *et al.*, 1993) e definida pela manifestação clínica de hipertensão arterial e proteinúria, após a segunda metade da gestação (Rein *et al.*, 2003; Paternoster *et al.*, 2004).

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

Segundo Huppertz (2008), a classificação da PE em precoce e tardia corresponde a diferentes formas da doença quanto à sua etiologia e quanto à forma clínica de manifestação. Quando seu aparecimento é precoce, apresenta-se na forma grave, geralmente associada com resultado anormal do Doppler da artéria uterina, fetos com restrição de crescimento intrauterino, resultados maternos e neonatais ruins (Murphy & Stirrat, 2000; Ness & Sibai, 2006) e maior taxa de recorrência (Redman & Sargent, 2005). Por outro lado, a pré-eclâmpsia tardia está frequentemente associada com índice de resistência uterina normal ou discretamente aumentado, baixa taxa de comprometimento fetal e resultados perinatais mais favoráveis (Sibai et al., 2005; Ness & Sibai, 2006).

A gestação normal é caracterizada por resposta inflamatória sistêmica leve, que se torna aparente durante a fase luteínica do ciclo menstrual, antes que ocorra a implantação e desenvolve-se com o progresso da gestação (Borzychowski et al., 2006). Essas alterações inflamatórias leves, resultantes da ativação da imunidade inata, não indicam doença, mas atuam como mecanismo protetor do organismo materno contra infecções, uma vez que a reatividade da resposta imune específica se encontra ligeiramente diminuída (Wegmann et al., 1993).

Na PE ocorre reação inflamatória sistêmica, semelhante à observada na

gestação normal, porém de maior intensidade (Redman & Sargent, 2005; Brewster et al., 2008). Portanto, essa doença parece ser resultante de uma ativação exacerbada da resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias, como monócitos e granulócitos, bem como células endoteliais (Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006). Assim, caracteriza-se por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Johnson et al., 2002; Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007) e quimiocinas (Visser et al., 2007), bem como por alterações na produção de citocinas reguladoras, como interleucina-10 (IL-10) e fator transformador do crescimento beta (TGF- β) (Pestka et al., 2004; Visser et al., 2007; Peraçoli et al., 2008). Observam-se concentrações elevadas de IL-1 β , IL-6 e de quimiocinas IL-8, CXCL10/IP-10 e MCP-1 na PE em comparação com gestantes normais (Gotsch et al., 2007; Szarka et al., 2010; Kalinderis et al., 2011; De Oliveira et al., 2011). Segundo Sharma et al. (2010) a produção anormal de citocinas e o distúrbio no balanço entre citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13) está envolvido na lesão vascular presente na PE.

O estresse oxidativo também está envolvido na fisiopatologia da PE (Kharb et al., 2000; Takagi et al., 2004), sendo decorrente da ativação dos leucócitos que, atuando de maneira sistêmica, causa lesão do endotélio, fenômeno diretamente relacionado com a doença (Rein et al., 2003). Assim, observa-se que o aumento da concentração plasmática de radicais livres antecede o aparecimento das manifestações clínicas da doença e apresenta correlação significativa com os valores de pressão arterial (Erskine et al., 1985). Kharfi et al. (2005) encontraram concentrações elevadas de gonadotrofina coriônica e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no soro de pacientes com PE em comparação com gestantes normotensas, mostrando haver correlação entre esses dois parâmetros. Peraçoli et al. (2011) mostraram que monócitos de gestantes com PE encontram-se ativados endogenamente e liberam concentrações significativamente maiores de TNF- α , ânion superóxido (O_2^-) e H_2O_2 quando comparados com monócitos de gestantes normotensas. Esses resultados confirmam que a PE é caracterizada por estresse oxidativo e que os monócitos maternos circulantes podem representar importante fonte de radicais livres e de citocinas inflamatórias durante a doença.

Na PE, a ativação excessiva de monócitos e granulócitos intravasculares, bem como de macrófagos sugere que a ativação do sistema imune inato pode causar problemas na progressão da gestação. Células do sistema imune inato expressam receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), considerados componentes centrais do sistema imune inato e que estão envolvidos na resposta inflamatória de monócitos (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Entre os vários PRRs a principal família é a dos receptores semelhantes ao *Toll* (TLRs), que reconhecem e ligam moléculas presentes na superfície de patógenos conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Koga & Mor, 2008). Uma família de receptores TLR foi descrita em mamíferos (Medzhitov & Janeway, 1997), havendo até o momento pelo menos 11 TLRs identificados em humanos e 13 em camundongos (Hurst & Von Landenberg, 2008). Esses receptores podem ser classificados de acordo com sua localização na célula: TLR-1/2/4/6/10 são expressos na superfície celular, enquanto TLR-3/7/8/9 são expressos em compartimentos endossomais intracelulares (Krutzik et al., 2003; Abbas et al., 2012). Estão presentes em várias células, predominantemente do sistema imune inato, como monócitos, macrófagos, granulócitos e células dendríticas (Rehli, 2002).

Os receptores TLR reconhecem não apenas componentes de microrganismos, contribuindo assim para a defesa do hospedeiro contra infecções, mas também ligam produtos endógenos de células do hospedeiro, que são liberados durante lesão tecidual e denominados “sinais de perigo” (Matzinger, 2002; Kim et al., 2005). A expressão de receptores TLR é descrita em tecidos presentes na interface materno-fetal, particularmente em células de Hofbauer, considerada um tipo de macrófago presente nos vilos placentários (Kumazaki et al., 2004), em células trofoblásticas (Mitsunari et al., 2006), células endoteliais e fibroblastos da placenta (Ma et al., 2007). Kim et al. (2005) demonstraram que a expressão de TLR4 está aumentada em células trofoblásticas de pacientes com PE, sendo induzida por estímulo *in vitro* com lipopolissacáride (LPS) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Segundo os autores, os “sinais de perigo” reconhecidos por esses receptores na interface materno-fetal podem desencadear um ambiente de citocinas desfavorável à gestação, sugerindo ser este um novo mecanismo que desencadeia a ativação do sistema imune inato na PE.

É descrito que, TLR4 juntamente com CD14 e a molécula adaptadora MD2 atuam como principal receptor para componentes de bactérias gram negativas, como LPS, enquanto o TLR2 é fundamental para a resposta inflamatória contra componentes de bactérias gram positivas, como peptidoglicano (PGN) (Schaaf et al., 2009). A ligação do complexo TLR4 e LPS resulta na ativação das células através da via de sinalização intracelular do fator de transcrição nuclear NF- κ B (Lu et al., 2008), causando a translocação da subunidade p65 do NF- κ B para o núcleo e induzindo a transcrição de genes relacionados à inflamação (Matsusaka et al., 1993; Striz et al., 2011). Na PE, monócitos apresentam maior ativação de NF- κ B quando comparada com gestantes normotensas (Luppi & Deloia, 2006), assim como a placenta de gestação complicada por PE apresenta maior expressão desse fator de transcrição (Aban et al., 2004). Giorgi et al. (2012) observaram aumento da ativação de NF- κ B em células mononucleares de sangue periférico de mulheres pré-eclâmpicas, associado à maior produção de TNF- α e IL-1 β .

Produção elevada de TNF- α foi detectada no plasma e em cultura de monócitos isolados de pacientes com PE (Beckmann et al., 2004; Peraçoli et al., 2007, 2011). Evidências de que infecções possam ter papel etiológico na PE ainda não foram documentadas, embora baixas doses de LPS administradas a ratas durante a prenhez induzem PE experimental (Faas et al., 1994). Esses dados sugerem o envolvimento do sistema imune inato na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

2. OBJETIVOS

- 2.1.** Determinar o estado de ativação endógena de monócitos pela expressão de receptores TLR2 e TLR4, bem como a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B nessas células em gestantes portadoras de PE distribuídas quanto à idade gestacional de aparecimento das manifestações clínicas (precoce ou tardia) da doença;
- 2.2.** Correlacionar a expressão de TLR2 e TLR4 com a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-10 (IL-10) e IL-12 por monócitos estimulados com lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS) e

peptidoglicano (PGN) de bactéria Gram-positiva em gestantes com PE precoce ou tardia;

2.3. Verificar se os parâmetros estudados diferenciam PE precoce e tardia.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

3.1. Sujeitos

Foram estudadas 60 gestantes portadoras de PE e 32 gestantes normotensas, que realizaram assistência pré-natal e/ou ao parto na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

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

As gestantes foram consideradas portadoras de PE quando, sem antecedente, manifestaram hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg) associada à proteinúria (≥ 300 mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20ª semana de gestação (NHBPEP, 2000).

As gestantes com PE foram estratificadas, segundo Huppertz (2008), em dois grupos, de acordo com a idade gestacional no momento do diagnóstico da doença: menor que 34 semanas (PE precoce – n=30) e igual ou maior que 34 semanas (PE tardia – n=30). As gestantes normotensas foram pareadas com as pré-eclâmpticas pela idade gestacional.

O tamanho amostral foi calculado considerando-se que a diferença entre os grupos de gestantes normais, gestantes portadoras de PE precoce e gestantes portadoras de PE tardia com relação à expressão de receptores TLR2 e TLR4 por monócitos, bem como da atividade do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a produção de citocinas por essas células será de pelo menos um desvio padrão, com significância de 5% e poder de 80%. Assim, foram necessárias, pelo menos, 16 gestantes por grupo estudado.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, protocolo CEP 3922-2011 (Anexo 1).

3.2. Critérios de inclusão

Ter gestação única e idade gestacional entre 24 e 40 semanas.

3.3. Critérios de exclusão

Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de pré-eclâmpsia tais como: gestação gemelar, pré-eclâmpsia anterior, hipertensão crônica, diabetes, doenças renais, doenças infecciosas, má-formação fetal, soro positividade para HIV e uso de drogas e álcool durante a gestação.

3.4. Dosagem da proteinúria

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

3.5. Colheita de sangue

No momento do diagnóstico da PE foram coletados 10 mL de sangue das gestantes, por punção venosa, para avaliação da expressão dos receptores TLR2 e TLR4, da ativação do NF- κ B e da produção de citocinas por monócitos. A amostra de sangue de gestantes normotensas foi coletada no momento em que foram pareadas pela idade gestacional com as gestantes pré-eclâmpicas.

3.6. Isolamento e cultura de monócitos

O sangue periférico obtido dessas gestantes foi colocado em tubo estéril contendo 20 UI/mL de heparina (Liquemine, Roche). As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), segundo a técnica descrita por Böyum (1968). O anel rico em células mononucleares foi lavado, duas vezes, com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) por 10 min a 200g. Após esses procedimentos as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI

suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL Life Technologies, Breda, The Netherlands) inativado (RPMI completo), sendo a identificação dos monócitos estimada por incorporação de vermelho neutro. Para isso, 50 µL da suspensão de células mononucleares foram incubadas por 10 min a 37°C com 450 µL da solução de vermelho neutro a 0,02%. Os monócitos foram identificados por apresentarem citoplasma de coloração vermelha e a concentração celular foi ajustada para 5×10^5 monócitos viáveis/mL, após contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer. Essas células foram distribuídas em placas de cultura de 24 orifícios ou em tubos de ensaio para citômetro (BD-Becton & Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ, USA) e incubadas por 60 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.

3.7. Expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de monócitos

A expressão de TLR2 e TLR4 por monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas foi determinada após 18 h de incubação sem estímulo (expressão endógena dos receptores) ou após estímulo de LPS ou PGN (expressão ativada) em concentração de 1 µg/mL, previamente padronizada em nosso laboratório. A concentração celular foi ajustada para 5×10^5 monócitos viáveis/mL, distribuídos em tubos Falcon para citômetro (BD). A seguir, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 conjugado com FITC (BioLegend), com anti-TLR4 conjugado com PE (BioLegend) e com anti-CD14 conjugado com PeCy7 (BioLegend) durante 20 min. Para cada teste, um tubo controle foi incubado com anticorpos isotípicos marcados com os fluorocromos específicos. Os monócitos foram centrifugados por 10 min a 200g para lavagem e ressuspendidos em 500 µL de ISOTON II e fixados com 50 µL de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (BD) usando programas “Cell Quest” (BD) para adquirir e analisar multiparâmetros celulares. Foi padronizada a aquisição de 20.000 eventos por amostra, sendo otimizada a população de interesse, estabelecendo-se *gate* (janela) com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL). A média de intensidade de

fluorescência (MIF) de TLR2 e TLR4 foi calculada a partir desse “gate”, estabelecido nos monócitos positivos para CD14.

3.8. Extração nuclear de células mononucleares

As células mononucleares de gestantes normotensas e com PE, obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare) foram cultivadas por 30 min na presença ou ausência de LPS e PGN em concentração de 1 µg/mL. Monócitos, na concentração de 5×10^5 células/mL, obtidos conforme descrito no item 3.6 foram submetidos à extração nuclear, utilizando-se o kit de extração nuclear (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). As células foram então centrifugadas a 4°C e 300 g por 5 min e ressuspensas em 5 mL de tampão fosfato-salino, gelado, contendo inibidores de proteases por 5 min a 300 g e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de tampão hipotônico gelado foram adicionados aos *pellets* e estes transferidos a microtubos. Após incubação por 15 min em banho de gelo, adicionou-se 50 µL de Nonidet P-40 e os microtubos foram centrifugados por 30 seg. O sobrenadante, contendo a fração citosólica dessas células foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos em 50 µL de tampão de extração nuclear completo e agitados por 15 min em agitador tipo Vortex e em seguida centrifugados a 14000 g a 4°C por 10 min. A fração nuclear presente no sobrenadante foi aliquoteada e armazenada a -80°C até sua utilização. A concentração protéica do extrato nuclear foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

3.9. Determinação da atividade de p65 NF-κB

Utilizando o kit específico de fator de transcrição p65 NF-κB (Cayman Chemical), 10 µL da fração nuclear obtida de monócitos foram analisados segundo as instruções do fabricante. O extrato nuclear foi incubado em placa de 96 poços contendo uma sequência específica de dupla fita de DNA (GGGACTTTCC 5'-3'), para avaliar a afinidade com a subunidade p65 NF-κB. A ligação de p65 NF-κB com o oligonucleotídeo alvo foi detectada através da incubação com um anticorpo primário específico para a forma ativada de p65 e, em seguida, visualizado por incubação com anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase em concentrações ideais em uma solução de desenvolvimento, tal

como descrito pelo fabricante. A concentração de p65 NF- κ B encontrada em monócitos obtidos de gestantes normotensas ou com PE foi quantificada em comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland). A concentração de p65 NF- κ B encontrada foi dividida pela quantidade de proteína nuclear presente nessas células e os resultados expressos em μ g de p65 NF- κ B/ μ g de proteína.

3.11. Obtenção de sobrenadante de cultura de monócitos

Para avaliação da produção de citocinas, os monócitos, obtidos conforme descrito no item 3.6, foram incubados a 37°C, em tensão de 5% de CO₂ por 18h, na ausência ou presença de LPS ou de PGN em concentração de 1 μ g/mL. O sobrenadante obtido após 18h de cultivo foi aspirado, centrifugado a 600g e distribuído em alíquotas, que foram conservadas a -80°C até o momento da dosagem das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12, por ensaio imunoenzimático (ELISA).

3.12. Determinação das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12

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

Placas de 96 orifícios e fundo plano (MaxiSorp-Nunc Life Tech. Inc., Maryland, MA, USA) foram sensibilizadas por 18 h a 5°C com anticorpo monoclonal anti-citocina específica, diluído em PBS. Após esse período, os orifícios foram lavados três vezes com 300 μ L de PBS, pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). Para o bloqueio da placa foi adicionado, em cada orifício, 300 μ L de PBS + soro albumina bovina (BSA-Sigma) 1%, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 60 min. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100 μ L dos sobrenadantes gerados e das citocinas recombinantes (R&D Systems) foram adicionados aos orifícios das placas. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente e nova lavagem da placa, foi adicionado o anticorpo revelador policlonal anti-citocina (R&D Systems), seguido de incubação por 2 h à temperatura

ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionados 100 µL de estreptoavidina conjugada com peroxidase (R&D Systems), na concentração de 2 µg/mL por 20 min a 37°C, seguido pela lavagem da placa com PBST. Após esse período, foram adicionados 100 µL do substrato enzimático, constituído por soluções estabilizadoras de peróxido de hidrogênio e de tetrametilbenzidina (DY999 – R&D Systems). As placas foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 20 min e a reação foi bloqueada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2M. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland) com comprimento de onda de 450 nm. As concentrações das citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura dos monócitos, tratados ou não com LPS e PGN, foram calculadas a partir das curvas-padrão realizadas com as diferentes citocinas recombinantes humanas. Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonais e policlonais, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas-padrão, foram as recomendadas pelo fabricante (R&D Systems). O limite de sensibilidade dos kits foi de 5,5 pg/mL para TNF- α , 3,9 pg/mL para IL-10, 15 pg/mL para IL-12p40 e 5pg/mL para IL-12p70.

3.13. Análise Estatística

Os resultados referentes à expressão dos receptores TLR2 e TLR4 e da produção de TNF- α , IL-10 e IL-12 por monócitos de gestantes com PE e gestantes normotensas foram analisados empregando-se análise de variância não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis). Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico INSTAT, GraphPad, San Diego, CA, USA (2000), com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Características dos grupos estudados

As características clínicas das gestantes normotensas e portadoras de PE encontram-se na Tabela 1. Não houve diferença estatística em relação à idade materna entre os grupos estudados. Quando os grupos de gestantes normotensas e com PE foram estratificados quanto à idade gestacional em < 34 semanas e \geq 34 semanas, não se observou diferença estatística entre os

mesmos. Os valores da pressão arterial sistólica e diastólica foram significativamente maiores nas gestantes portadoras de PE em relação às gestantes normotensas. Os níveis de proteinúria foram significativamente maiores ($p < 0,01$) no grupo de gestantes com PE precoce em comparação aos demais grupos.

Tabela 1. Características das gestantes normotensas e portadoras de pré-eclâmpsia.

Parâmetros	Normotensas (< 34sem) n = 16	Normotensas (≥ 34sem) n = 16	PE Precoce (< 34sem) n = 30	PE Tardia (≥ 34sem) n = 30
Idade (anos)	23 (17 – 42)	22 (15 – 32)	23 (14 – 43)	24 (15 – 43)
Idade gestacional (semanas)	29 (24 – 33)	37 (34 – 40)	31 (24 – 33)	37 (34 – 42)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	105 (95 – 110)	100 (95 – 110)	160 * (140 – 210)	150 * (140 – 210)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	65 (60 – 70)	60 (60 – 70)	110 * (90 – 140)	100 * (90 – 130)
Proteinúria (mg/24h)	<300	<300	1970 ** (320-39.600)	720 (300-17.550)

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

* ($p < 0,01$) vs NT < 34 s e NT ≥ 34 s; ** ($p < 0,01$) vs NT < 34 s, NT ≥ 34 s e PE tardia (teste de Kruskal-Wallis).

4.2. Expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de monócitos

A expressão de TLR2 por monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas (Figura 1A) foi semelhante entre os grupos estudados. Não se observou diferença significativa entre os grupos tanto quando as células foram cultivadas sem estímulo (expressão endógena) quanto quando estimuladas com LPS ou PGN.

A expressão basal de TLR4 foi significativamente maior em monócitos de gestantes portadoras de PE precoce e PE tardia, em comparação com os respectivos grupos de gestantes normotensas, pareadas pela idade gestacional. Entre as gestantes portadoras de PE a expressão de TLR4 foi mais elevada no grupo com PE precoce. O estímulo das células com LPS e PGN não interferiu com a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 pelas células das gestantes com PE. Porém, gestantes normotensas apresentaram aumento na expressão de receptores TLR4 em monócitos estimulados com LPS.

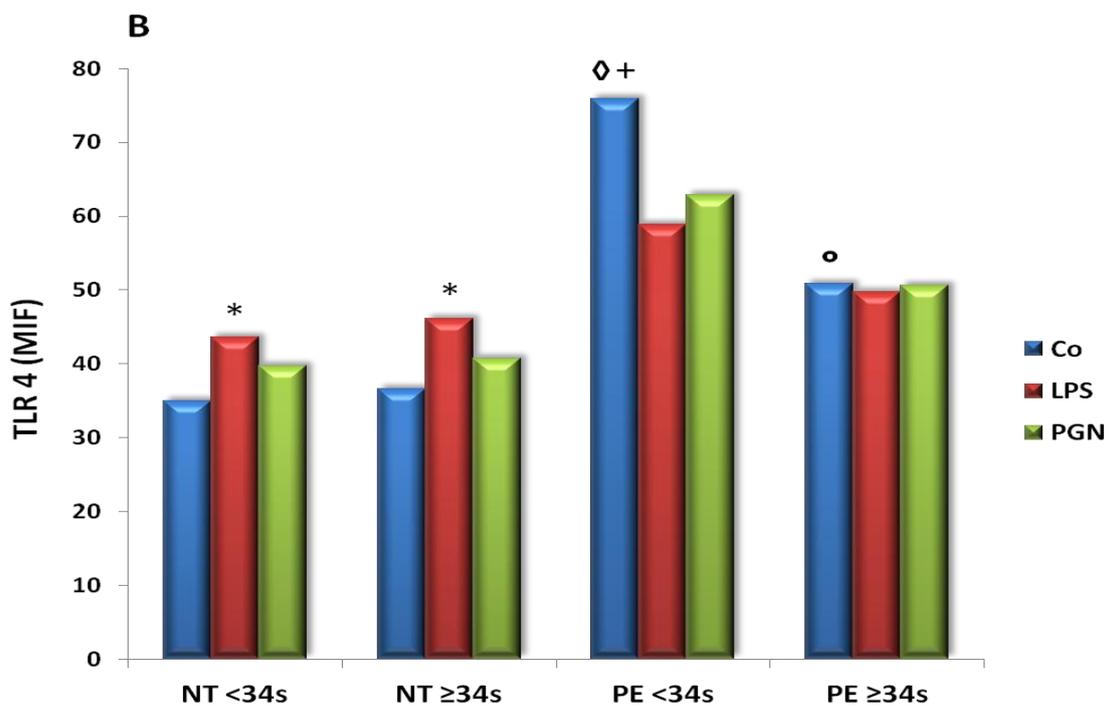
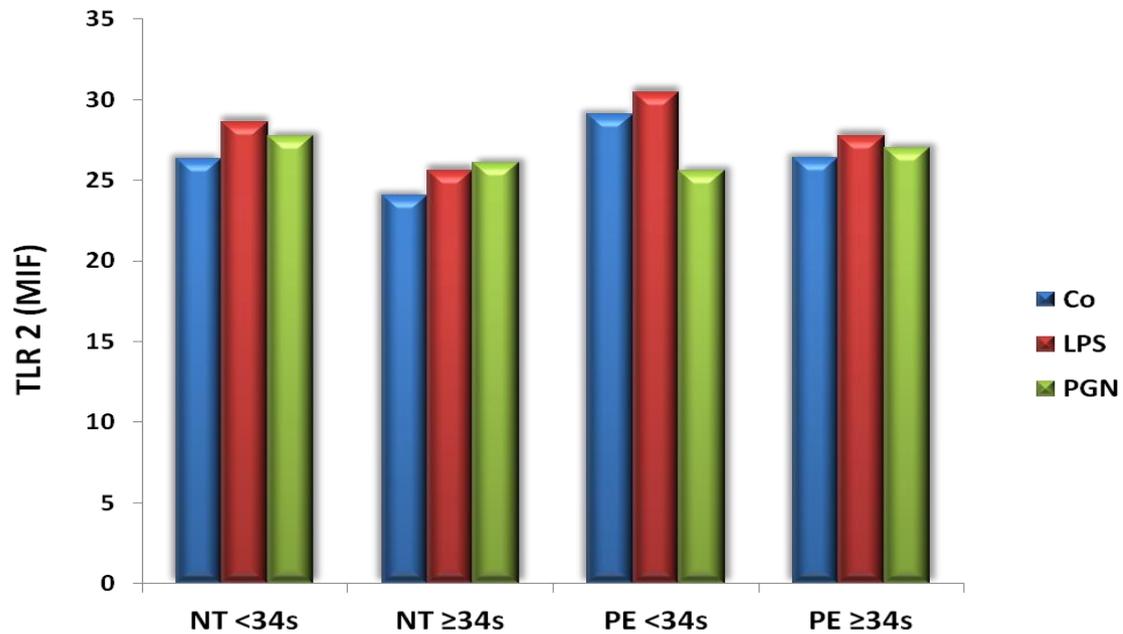


Figura 1. Média de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão de TLR2 e TLR4 por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e gestantes normotensas (NT), sem estímulo (Co) e após estímulo com lipopolissacáride (LPS) ou peptidoglicano (PG) por 18h. Os resultados foram expressos em mediana de 16 gestantes NT e 30 gestantes PE em cada grupo.

◇ (p <0,05) vs. PE≥34s; * (p <0,05) vs. Co; + (p <0,05) vs. NT<34s; ° (p<0,05) vs. NT≥34s (Teste de Kruskal- Wallis).

4.3. Determinação de NF-κB em monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e normotensas

Os monócitos de gestantes com PE apresentaram maior ativação endógena do fator de transcrição nuclear NF-κB quando comparados com os de gestantes normotensas, de mesma idade gestacional (Figura 2). Comparando-se PE precoce e PE tardia não houve diferença estatisticamente significativa.

Após estímulo dos monócitos com LPS e PGN, os dois grupos de gestantes normotensas mostraram aumento significativo nos valores de NF-κB quando comparadas com as culturas controle, não estimuladas. Gestantes com PE apresentaram menor ativação de NF-κB quando comparadas com as culturas controle. O grupo de PE precoce apresentou valores significativamente menores quando os monócitos foram estimulados com LPS e PGN em comparação às gestantes normotensas com idade gestacional < 34 semanas. Porém, o grupo PE tardia somente apresentou diferença quando as células foram estimuladas com LPS e comparadas com o grupo de normotensas com gestação ≥ 34 semanas.

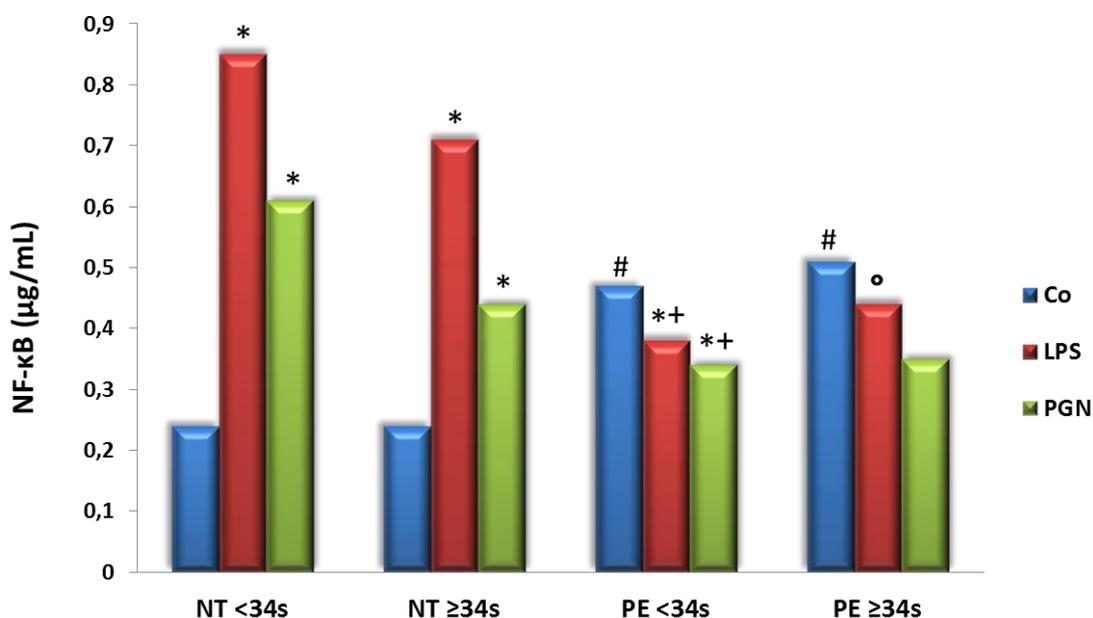


Figura 2. Concentração de NF-κB em extrato nuclear de monócitos em gestantes normotensas (NT) e gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE). A ativação endógena (Co) e após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) e peptidoglicano (PGN) foram avaliados após 30 min. Os resultados foram expressos em mediana de 16 gestantes NT e 30 gestantes PE em cada grupo.

* (p < 0,05) vs. Co; # (p < 0,05) vs. NT <34s e NT ≥34s; + (p < 0,01) vs. NT <34s; ° (p < 0,05) vs. NT ≥34s (Teste de Kruskal-Wallis).

4.4. Produção de citocinas por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e normotensas

4.4.1. Produção de TNF- α e IL-10

Observou-se aumento significativo nos níveis de TNF- α produzidos por monócitos não estimulados em gestantes portadoras de PE precoce e tardia, quando comparadas às gestantes normotensas, de mesma idade gestacional, demonstrando a ativação endógena dos monócitos em gestantes com PE (Figura 3A). Comparando-se os grupos PE precoce e PE tardia não se observou diferença significativa.

Após estímulo dos monócitos com LPS e PGN os quatro grupos estudados mostraram concentrações de TNF- α significativamente maiores quando comparadas com as culturas controle, não estimuladas. Porém, os monócitos do grupo normotensas produziram níveis significativamente maiores da citocina inflamatória do que as células das gestantes portadoras de PE.

Gestantes normotensas apresentaram maior concentração endógena de IL-10 (Figura 3B) do que as portadoras de PE. Entre as gestantes portadoras de PE, a produção de IL-10 foi significativamente maior no grupo PE tardia. Houve produção significativamente maior de IL-10 nos quatro grupos estudados quando as células foram estimuladas com LPS e PGN, em relação à produção endógena. Apesar do aumento da produção da citocina pelas células após estímulo, os níveis foram significativamente menores nos grupos de gestantes com PE precoce e tardia em comparação com os grupos de gestantes normotensas. O estímulo com LPS induziu a produção de níveis significativamente mais elevados de IL-10 nas pacientes com PE tardia em relação às com PE precoce.

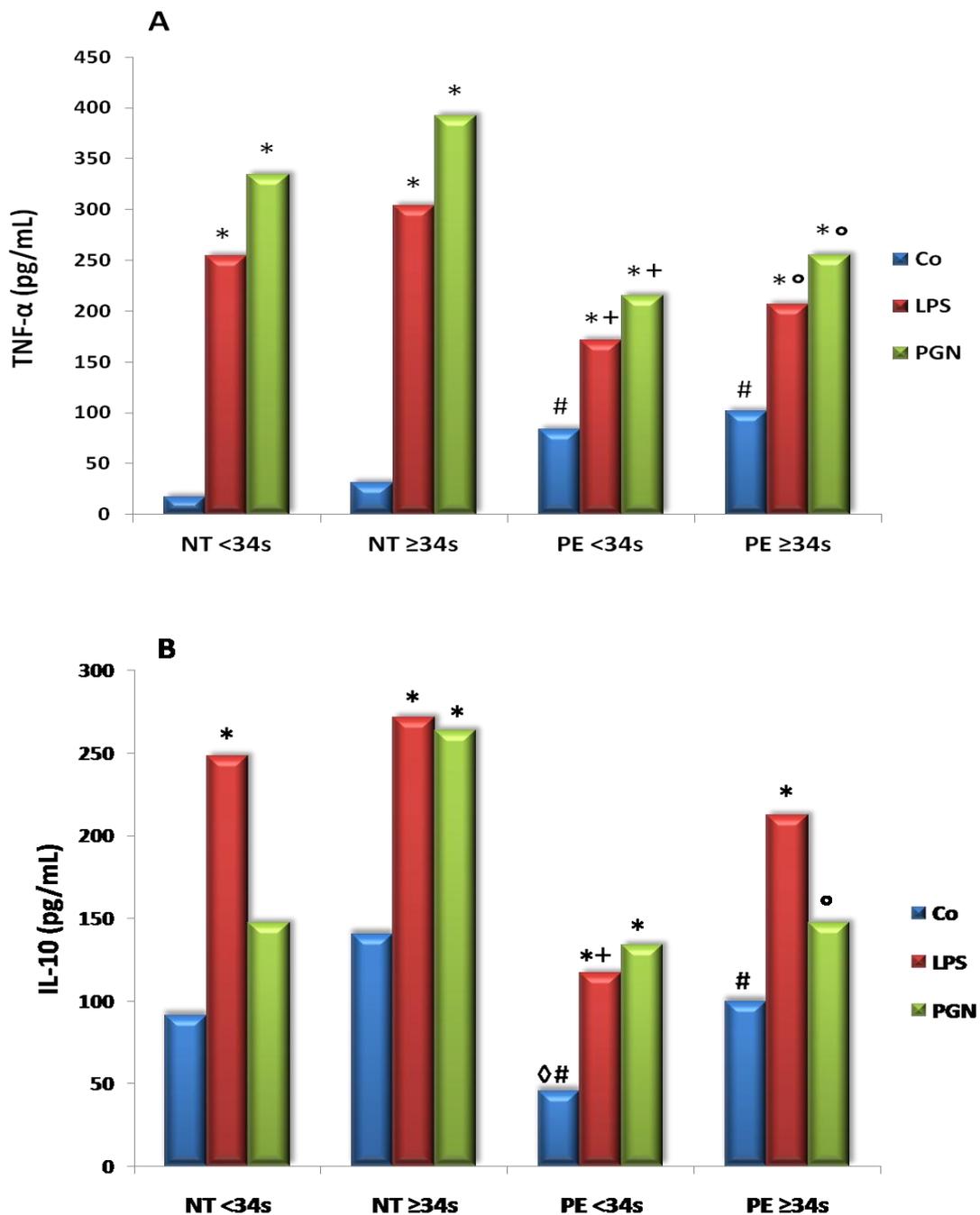


Figura 3. Concentração de TNF- α (A) e IL-10 (B) em sobrenadante de cultura de monócitos em gestantes normotensas (NT) e gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE). Os níveis de produção endógena (Co) e após estímulo com lipopolissacáride (LPS) e peptidoglicano (PGN) foram avaliados após 18h. Os resultados foram expressos em mediana de 16 gestantes NT e 30 gestantes PE em cada grupo.

◇ ($p < 0,05$) vs. PE \geq 34s; * ($p < 0,05$) vs. Co; # ($p < 0,05$) vs. NT<34s e NT \geq 34s; + ($p < 0,05$) vs. NT<34s; ° ($p < 0,05$) vs. NT \geq 34s (Teste de Kruskal-Wallis).

4.4.2. Produção de IL-12p40 e IL-12p70

Os níveis endógenos tanto de IL-12p40 quanto de IL-12p70 nas culturas de monócitos foram significativamente maiores nas gestantes portadoras de PE, quando comparadas com o grupo de gestantes normotensas (Figura 4). Porém, o grupo de PE precoce apresentou concentrações significativamente mais elevadas de IL-12p40 do que o grupo PE tardia, sugerindo um estado inflamatório exacerbado na PE precoce. O contrário foi observado com a IL-12p70, onde o grupo de PE tardia apresentou maior concentração do que o grupo de PE precoce.

Quando os monócitos foram estimulados com LPS e PGN observou-se aumento significativo na produção tanto de IL-12p40 como de IL-12p70 nos dois grupos de gestantes normotensas em relação às culturas controle. Nas gestantes com PE precoce não houve aumento da produção de IL-12p40 após os dois estímulos, em comparação com a produção endógena (Figura 4A). Na PE tardia ambos os estímulos induziram a produção de maior concentração de IL-12p40 em comparação aos valores endógenos. Os valores elevados dessa citocina nos grupos com PE permaneceram significativamente maiores em relação ao grupo de gestantes normotensas de mesma idade gestacional.

A análise da produção de IL-12p70 (Figura 4B) mostra que o estímulo dos monócitos com LPS e PGN induziu a produção de concentrações significativamente maiores do que nas culturas controle em todos os grupos estudados, com exceção do grupo PE tardia. Nesse grupo, os valores endógenos, assim como os estimulados foram significativamente maiores do que os obtidos no grupo de gestantes normotensas. Semelhante aos resultados obtidos na determinação de IL-12p40, os valores de IL-12p70 foram significativamente maiores em ambos os grupos de PE, precoce e tardia, em comparação aos de gestantes normotensas.

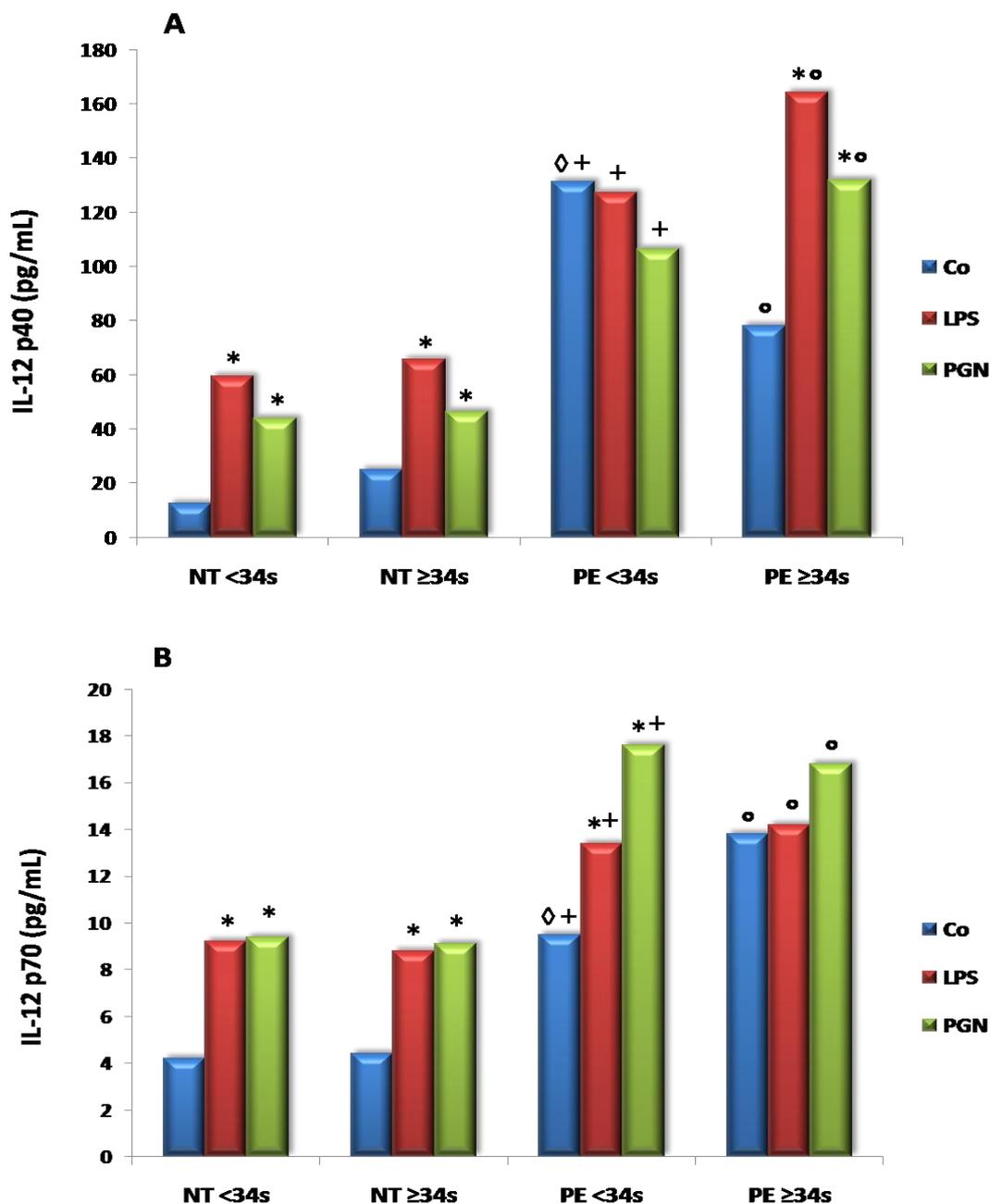


Figura 4. Concentração de IL-12p40 (A) e IL-12p70 (B) em sobrenadante de cultura de monócitos em gestantes normotensas (NT) e gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE). Os níveis de produção endógena (Co) e após estímulo com lipopolissacáride (LPS) e peptidoglicano (PGN) foram avaliados após 18h. Os resultados foram expressos em mediana de 16 gestantes NT e 30 gestantes PE em cada grupo.

◇ (p <0,05) vs. PE≥34s; * (p <0,05) vs. Co; + (p <0,05) vs. NT<34s; ° (p<0,05) vs. NT≥34s (Teste de Kruskal-Wallis).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho demonstramos que monócitos do sangue periférico de gestantes portadoras de PE estão ativados endogenamente, com maior expressão de receptores TLR4, ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias. Esses resultados confirmam evidências anteriores da ativação exacerbada de leucócitos circulantes nessas pacientes (Gervasi et al., 2001; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2011; Giorgi et al., 2012) e mostram que o estado inflamatório sistêmico é mais intenso na PE precoce.

A maior expressão de TLR4 por monócitos de gestantes pré-eclâmpticas, confirma os resultados de outros autores que relataram aumento da expressão de TLR2 e TLR4 em neutrófilos do sangue periférico (Xie et al., 2010), de TLR4 em placentas de gestantes portadoras de PE (Kim et al., 2005) e de TLR4 em células mononucleares de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos de gestantes pré-eclâmpticas, em comparação com gestantes normotensas (Xia et al., 2010). Segundo Kim et al. (2005), a co-localização de TLR4 e TNF- α em células trofoblásticas do leito placentário, em pacientes com PE, sugere que a ativação dessas células na interface materno-fetal pode induzir um ambiente de citocinas desfavorável à gestação, podendo ser este um novo mecanismo que desencadeia a ativação do sistema imune inato na PE.

Observou-se também diferença significativa entre os grupos de PE precoce e tardia, com maior expressão de TLR4 por gestantes do grupo PE precoce. Considerando que a PE precoce está associada com maior comprometimento placentário (Moldenhauer et al., 2003; van der Merwe et al., 2010; Ogge et al., 2011) do que a PE tardia, é possível que fatores liberados pelo tecido lesado estejam presentes no sangue, sendo capazes de se ligar ao TLR, aumentando assim sua expressão nessas pacientes.

Produtos inflamatórios gerados endogenamente e liberados durante lesão tecidual, denominados “sinais de perigo” ou alarminas são reconhecidos por receptores TLR levando à ativação celular (Matzinger, 2002; Kim et al., 2005; Sado et al., 2011). Estes produtos incluem moléculas como reativos intermediários do oxigênio (Frantz et al., 2001), proteínas liberadas de células mortas (Park et al., 2004) e produtos liberados da matriz extracelular, como

fibronectina (Okamura et al., 2001). Assim, os TLRs podem detectar, em certas circunstâncias, moléculas derivadas do hospedeiro e agentes não infecciosos (Xie et al., 2010a). Proteínas de choque térmico (Hsps) são consideradas “sinais de perigo” e podem ativar o sistema imune em locais de lesão tecidual ou estresse, onde são liberadas extracelularmente (Chen et al., 1999; Williams & Ireland, 2008). Essas proteínas podem ser ligantes endógenos de TLR2 e TLR4 (Vabulas et al., 2002; Asea et al., 2002) e ativam a via do fator de transcrição nuclear (NF- κ B) após ligação a TLR2 e TLR4, induzindo a produção de citocinas inflamatórias e peptídeos anti-microbianos (Xie et al., 2010a). Peraçoli et al. (2012) detectaram concentração sérica elevada de Hsp70 em gestantes portadoras de PE precoce, sendo a mesma significativamente maior do que a obtida em gestantes portadoras de PE tardia. Portanto, vários produtos endógenos presentes na circulação materna de gestantes pré-eclâmpticas, entre eles a Hsp70, poderiam agir como sinais de perigo, causando maior expressão de TLR4 nas gestantes com PE precoce.

Observamos que a maior ativação endógena de NF- κ B, detectada nos dois grupos de gestantes com PE, esteve associada à maior produção de citocinas inflamatórias por monócitos dessas pacientes em comparação com as gestantes normotensas. A produção endógena elevada de TNF- α em gestantes com PE, observada no presente trabalho, 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 doença. O NF- κ B regula a transcrição dos genes relacionados à inflamação (Matsusaka et al., 1993; Striz et al., 2011) e o TNF- α , por sua vez, age estimulando a ativação do NF- κ B, mantendo um ciclo de ativação celular (Vallabhapurapu & Karin, 2009).

Na produção de IL-12 por monócitos de gestantes normotensas e de portadoras de PE foi avaliada a IL-12p70, considerada IL-12 biologicamente ativa e constituída por duas subunidades, os heterodímeros p40 e p35, além de IL-12p40, que representa o monômero p40, produzido em maior concentração que a IL-12p70. A IL-12 é liberada a partir de células apresentadoras de antígeno ativadas, incluindo células dendríticas, monócitos, macrófagos, células B e neutrófilos e atua aumentando a ativação de células T. Embora a forma p35 seja

amplamente expressa em células, é secretada apenas em combinação com a subunidade p40 (Rea et al., 2000).

Os resultados do presente trabalho mostram níveis endógenos significativamente maiores tanto de IL-12p40 quanto de IL-12p70 nas culturas de monócitos de gestantes portadoras de PE, quando comparadas com o grupo de normotensas. Porém, o grupo de PE precoce apresentou concentrações significativamente maiores de IL-12p40 do que o grupo PE tardia, sugerindo uma exacerbação do estado inflamatório na PE precoce. O contrário foi observado com a IL-12p70, onde o grupo de PE tardia apresentou maiores concentrações que o grupo de PE precoce. A comparação entre os níveis de IL-12 no grupo de gestantes com PE sugere que a alta produção endógena de IL-12p40 pode estar regulando negativamente a produção de IL-12p70. Estudos avaliando níveis de IL-12 no soro, plasma e sobrenadante celular de gestantes portadoras de PE mostram resultados conflitantes na literatura (Sacks et al., 1997; Daniel et al., 1998; van Nieuwenhoven et al., 2008). Nossos resultados concordam com os de Sakai et al. (2002), que demonstraram ser a concentração de IL-12, secretada por células mononucleares de pacientes com PE, significativamente maior que a de gestantes normais e mulheres não-grávidas.

A produção de IL-12p40 por monócitos, encontrada no presente trabalho, concorda com relatos da literatura, mostrando que essa forma monomérica da IL-12 é produzida em altas concentrações em comparação com a IL-12p70 biologicamente ativa (Watford et al., 2003). A subunidade p40 liga-se a fatores de transcrição como NF- κ B, regulando a ativação da célula e a produção de outras citocinas inflamatórias (Gri et al., 1998). Esses resultados falam a favor da hipótese de que essa citocina inflamatória seja produzida principalmente por células da imunidade inata, que se encontram ativadas na gestação normal e em maior grau na PE (Faas & Schuiling, 2001; Brewster et al., 2008).

Gestantes normotensas apresentaram maiores concentrações endógenas de IL-10 em relação às portadoras de PE. Essa maior produção de IL-10 nas gestantes normais sugere a predominância de um perfil Th2 anti-inflamatório de resposta nessas mulheres, próprio da gestação, havendo predomínio de IL-10 sobre TNF- α para minimizar os efeitos deletérios de uma resposta inflamatória excessiva. Na PE esse balanço encontra-se alterado com aumento de TNF- α e diminuição de IL-10 (Marzi et al., 1996; Cristófalo et al., 2013). No presente

estudo, a maior produção de IL-10 por monócitos de gestantes normotensas corrobora os achados da literatura, que relatam maior produção em gestantes normotensas e queda da produção dessa citocina nas gestantes com PE (Azizieh et al., 2005; Boreckci et al., 2007). Entre as gestantes pré-eclâmpticas observaram-se maiores concentrações de IL-10 na PE tardia.

A IL-10 exerce potente efeito anti-inflamatório, considerado importante na manutenção da gestação (Chaouat et al., 1995; Hanna et al., 2000) e é responsável por suprimir a produção de citocinas inflamatórias por monócitos ativados, além de ser importante para a manutenção da gestação através da maturação de corpos lúteos (Hashii et al, 1998; Sharma et al, 2007). A função da IL-10 inclui não apenas a atividade imunomodulatória, mas também o papel protetor da hipertensão ou da disfunção vascular induzida pela inflamação (Kalkunte et al., 2011). Tinsley et al. (2010) avaliaram o papel da IL-10 sobre a função endotelial e pressão arterial em modelo experimental, demonstrando a capacidade desta interleucina em normalizar a função endotelial e diminuir a pressão sanguínea sistólica.

Após estímulo dos monócitos com LPS e PGN, os quatro grupos estudados mostraram concentrações de TNF- α significativamente maiores quando comparadas com as culturas controle, não estimuladas. Porém, os monócitos dos dois grupos de gestantes pré-eclâmpticas produziram níveis significativamente menores da citocina inflamatória em comparação às gestantes normotensas. Nas gestantes com PE precoce e tardia, tanto a produção de TNF- α quanto ativação da NF- κ B foram significativamente menores nas gestantes pré-eclâmpticas quando os monócitos foram estimulados com LPS. Esses resultados concordam com os de Giorgi et al. (2012), que verificaram associação entre menor produção de TNF- α e IL-1 β e ativação de NF- κ B por células mononucleares de gestantes portadoras de PE após estímulo com LPS. Considerando que o NF- κ B está envolvido na produção de TNF- α , nossos resultados corroboram a ideia de exaustão das células *in vivo* de mulheres com PE, sugerida por Beckmann et al. (2004).

A possível tolerância ao LPS em gestantes com PE, com menor produção de TNF- α foi descrita por outros autores (Beckmann et al., 2004), sugerindo que a pré-ativação endógena e exaustão dos leucócitos, expressas pela liberação

espontânea elevada de TNF- α , poderia determinar a menor resposta ou tolerância ao LPS (Aneja et al., 2008). Assim, a tolerância induz um estado transitório de supressão celular, com produção diminuída de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS (Virca et al., 1989).

Os resultados do presente trabalho permitem sugerir que a ativação prévia das células, com maior ativação do NF- κ B e produção endógena elevada de TNF- α e IL-12, sejam responsáveis pela tolerância aos agonistas dos receptores TLR, quando as células são estimuladas in vitro com LPS e PGN. Além disso, outras proteínas intracelulares, como a proteína de choque térmico Hsp70, quando presente no compartimento extracelular pode induzir a tolerância ao LPS (Aneja et al., 2006). Mazouni et al. (2008) avaliaram na PE a produção de TNF- α e IL-10 por monócitos estimulados com PGN e LPS, ligantes de TLR2 e TLR4 respectivamente e observaram que a produção de TNF- α estava significativamente diminuída na PE, enquanto a de IL-10 não se alterou.

Após estímulo com LPS e PGN, observou-se aumento significativo na produção de IL-12p40 e de IL-12p70 nos dois grupos de gestantes normotensas em relação à cultura controle. Nas gestantes com PE precoce e tardia não houve aumento da produção de IL-12p40 e IL-12p70 após os dois estímulos, respectivamente, em comparação com a produção endógena. Esses resultados sugerem a menor capacidade de produção da citocina induzida por LPS e PGN.

No presente estudo houve produção significativamente maior de IL-10 nos quatro grupos estudados quando as células foram estimuladas com LPS e PGN, em relação à produção endógena. Apesar do aumento da produção da citocina pelas células após estímulos, os níveis foram significativamente menores nos dois grupos de gestantes com PE precoce e tardia, em comparação com os grupos de gestantes normotensas. A menor produção de IL-10, por células mononucleares do sangue periférico não estimuladas ou ativadas por mitógenos, também foi observada por outros autores na PE (Darmochwal-Kolarz et al., 2002; Orange et al., 2003; Azizieh et al., 2005). Assim, o aumento da resposta inflamatória na PE, com maior produção de TNF e IL-12, pode ser conseqüente à diminuição dos níveis de IL-10, uma vez que essa citocina regula a produção de citocinas inflamatórias por monócitos, como TNF- α , (Niho et al., 1998).

Os resultados do presente trabalho sugerem que tanto a produção endógena como estimulada por LPS e PGN de TNF- α , IL-10 e IL-12 por monócitos de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas, pode ser dependente da ativação do NF- κ B, após interação desses componentes com TLR4 e TLR2. Comparando gestantes portadoras de PE precoce e tardia, a maior expressão de TLR4 e, a produção de IL-10 e IL-12 por monócitos diferenciaram essas duas formas de manifestação da PE. Por outro lado, a comparação entre gestantes normotensas e pré-eclâmplicas mostra o desequilíbrio na produção de citocinas por monócitos do sangue periférico, nas gestantes com PE. Esse desequilíbrio, representado por níveis endógenos elevados de TNF- α e IL-12 e diminuídos de IL-10, associados à menor capacidade de ativação dessas células após estímulo com LPS e PGN sugere o comprometimento funcional dessas células na PE.

Portanto, novos estudos deverão ser realizados no sentido de esclarecer se esses distúrbios imunes podem representar causa ou consequência da PE e seu envolvimento na fisiopatologia dessa doença gestacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aban M, Cinel L, Arslan M, Dilek U, Kaplanoglu M, Arpaci R, Dilek S. Expression of nuclear factor-kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: an immunohistochemical study. *Tohoku J Exp Med.* 2004; 204(3):195-202.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pilai S. *Imunologia celular e molecular.* 7ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier Editora Ltda; 2012. p. 55-88.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. *Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia.* ACOG Practice Bulletin no. 33. Washington, DC.: ACOG; 2002.
- Aneja R, Odoms K, Dunsmore K, Shanley TP, Wong HR. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J Immunol.* 2006; 177(10):7184-7192.
- Aneja RK, Tsung A, Sjodin H, Geffer JV, Delude RL, Billar TR, Fink MP. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance. *J Leukoc Biol.* 2008; 84(5):1326-34.

- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002; 277(17):15028-34.
- Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2005; 54(1):30-7.
- Beckmann I, Efraim SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. *Hypertens Pregnancy.* 2004; 23(3):319-29.
- 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(1):56-64.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11(5):309-16.
- 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.
- Brewster JA, Orsi NM, Gopichandran N, McShane P, Ekbote UV, Walker JJ. Gestational effects on host inflammatory response in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008; 140(1):21-6.
- Carty DM, Delles C, Dominiczak AF. Preeclampsia and future maternal health. *J Hypertens.* 2010; 28(7):1349-55.
- Chaouat G, AssalMeliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-g. *J Immunol.* 1995; 154(9):4261-8.
- Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol.* 1999; 162(6):3212-9.
- 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 Jan 15.
- Daniel Y, Kupferminc MJ, Baram A, Jaffa AJ, Fait G, Wolman I, Lessing JB. Plasma interleukin-12 is elevated in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 1998 ;39(6):376-80.

- 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 Dec;48(6):381-6.
- De Oliveira LG, Saraiva NO, Peraçoli JC, Peraçoli MT, Moron AF, Sass N. sFlt-1 and IP-10 in women with early-onset preeclampsia. *Pregnancy Hypert: Int J Women's Cardiovasc Health* 2011; 1:129-31.
- Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in perinatology.* 2009; 33(3): 130-7.
- Erskine KJ, Iversen SA, Davies R. An altered ratio of 18:2 (9,11) to 18:2 (9,12) linoleic acid in plasma phospholipids as a possible predictor of preeclampsia. *Lancet* 1985;1(8428):554-5.
- Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Visscher CA, Bakker WW. A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 171(1):158-64.
- Faas M, Schuiling GA. Pre-eclampsia and the inflammatory response. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 95(2):213-7.
- Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276(7):5197-203.
- Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E, Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185(4):792-7.
- 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(1-2):67-72.
- Gotsch F, Romero R, Friel L, Kusanovic JP, Espinoza J, Erez O, Than NG, Mittal P, Edwin S, Yoon BH, Kim CJ, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T, Hassan SS. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007; 20(11):777-92.
- Gri G, Savio D, Trinchieri G, Ma X. Synergistic regulation of the human interleukin-12 p40 promoter by NFkappaB and Ets transcription factors in Epstein-Barr virus-transformed B cells and macrophages. *J Biol Chem.* 1998; 273(11):6431-8.
- Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury JF, Sharma S. Gestational age-dependent expression of interleukin-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol.* 2000; 164(11):5721-8.

- Hashii K, Fujiwara H, Yoshioka S, Kataoka N; Yamada S; Hirano T; Mori T; Fuji S; Maeda M. Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and nonpregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation. *Hum Reprod.* 1998; 13(10):2738-44.
- Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension.* 2008; 51(4):970-5.
- Hurst J, von Landenberg P. Toll-like receptors and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008; 7(3):204-8.
- Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P, Sooranna SR, Steer PJ. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction? *Br J Obstet Gynaecol.* 2002; 109(7):836-9.
- Kalinderis M, Papanikolaou A, Kalinderi K, Ioannidou E, Glannoulis C, Karagiannis V, Tarlatzis BC. Elevated Serum Levels of Interleukin-6, Interleukin-1 β and Human Chorionic Gonadotropin in Pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2011; 66(6):468-75.
- Kalkunte S, Nevers T, Norris WE, Sharma S. Vascular IL-10: a protective role in preeclampsia. *Journal of reproductive immunology* 2011; 88(2): 165-9.
- Kharb S, Gulati N, Singh V, Singh GP. Superoxide anion formation and glutathione levels in patients with preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49(1):28-30.
- Kharfi A, Giguère Y, De Grandpré P, Moutquin JM, Forest JC. Human chorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. *Clin Biochem* 2005; 38(8):717-21.
- Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, Nien JK, Gomez R, Mazor M, Saito S, Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193(3 Pt 2):921-7.
- Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2008; 15(3):231-42.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003; 9(5):525-32.
- Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol.* 2004; 35(1):47-54.

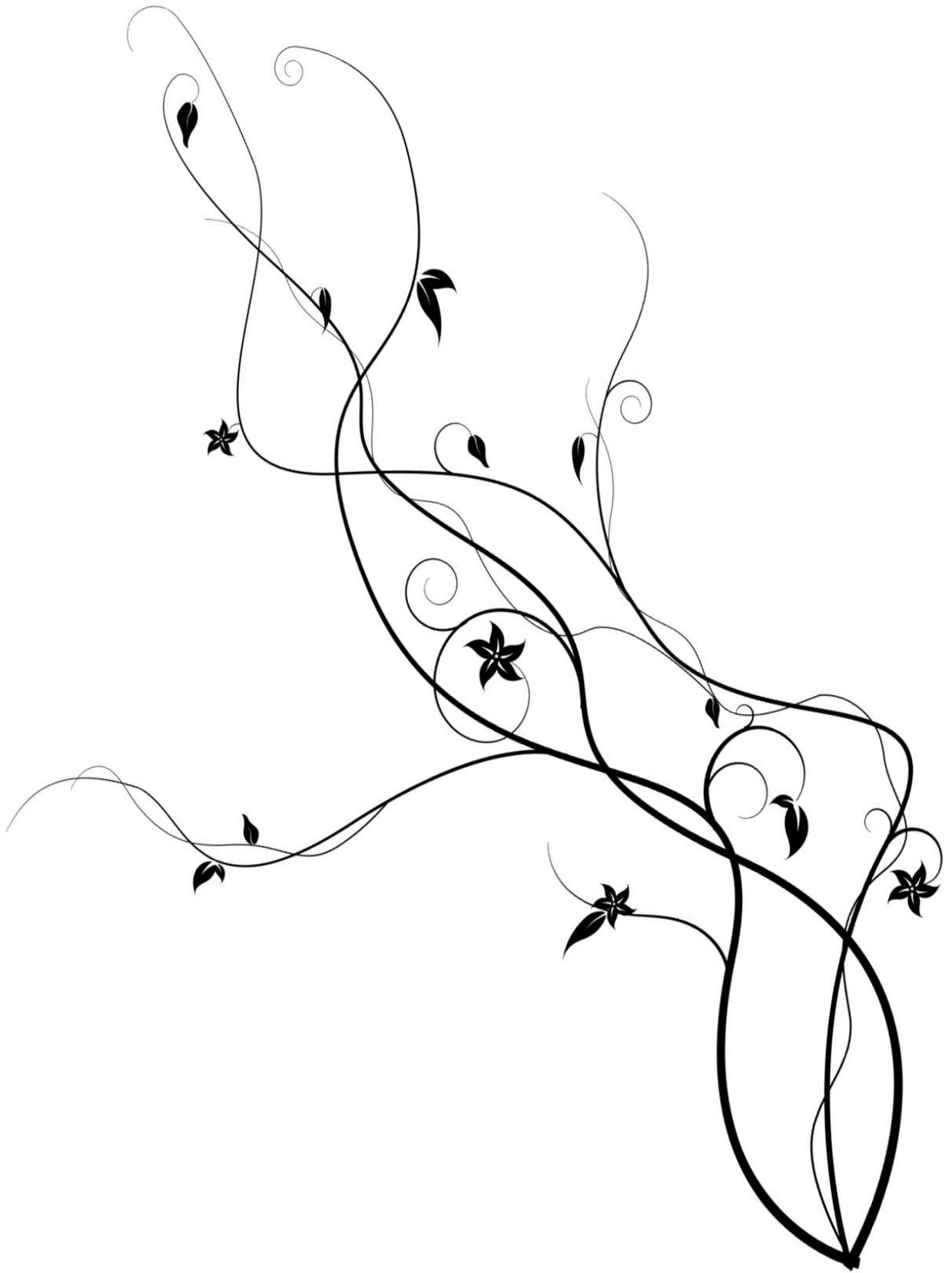
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42: 145-151.
- Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.* 2006; 118(2-3):268-75.
- Ma Y, Krikun G, Abrahams VM, Mor G, Guller S. Cell type-specific expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. *Placenta.* 2007; 28(10):1024-31.
- Marzi M; Viganò A; Trabattoni D; Villa ML; Salvaggio A; Clerici E; Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy." *Clin ex immunol.* 1996; 106(1): 127-33.
- Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci* 1993; (90):10193-7.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002; 296(5566):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(1):80-3.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997; 91(3):295-8.
- Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T, Tsukihara S, Iwabe T, Harada T, Terakawa N. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J Reprod Immunol.* 2006; 72(1-2):46-59.
- Moldenhauer JS, Stanek J, Warshak C, Khoury J, Sibai B. The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189(4):1173-7.
- Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2000; 19(2):221-31.
- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(1):S1-S22.

- Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195(1):40-9.
- Niho Y, Niino H, Tanaka Y, Nakashima H, Otsuka T. Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. *Acta Haematol.* 1998; 99(3):165-70.
- Ogge G, Chaiworapongsa T, Romero R, Hussein Y, Kusanovic JP, Yeo L, Kim CJ, Hassan SS. Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia. *J Perinat Med.* 2011; 39(6):641-52.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001; 276(13):10229-33.
- Orange S, Horvath J, Hennessy A. Preeclampsia is associated with a reduced interleukin-10 production from peripheral blood mononuclear cells. *Hypertens Pregnancy.* 2003;22(1):1-8.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004; 279(9):7370-7.
- Paternoster DM, Fantinato S, Manganelli F, Nicolini U, Milani M, Girolami A. Recent progress in the therapeutic management of pre-eclampsia. *Expert Opin Pharmacother.* 2004; 5(11):2233-9.
- Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2007; 57(3):177-85.
- Peraçoli 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(1):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(6):460-7
- Peracoli JC, Bannwart-Castro CF, Giorgi VSI, Weel IC, Romao M, Witkin SS, Borges VTM, Rudge MVC, Peracoli MTS. The role of heat shock protein 60 and 70 in early- and late-onset preeclampsia differentiation. *Preg Hypertension.* 2012; 2(3): 275.
- 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.

- Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. Total serum IL-12 and IL-12p40, but not IL-12p70, are increased in the serum of older subjects; relationship to CD3(+) and NK subsets. *Cytokine* 2000;12(2):156-9.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180(2 Pt 1):499-506.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta.* 2003; 24(suppl A):S21-S27.
- Redman CW; Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005; 308(5728):1592-4.
- Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol.* 2002; 23(8):375-8.
- Rein DT, Breidenbach M, Hönsheid B, Friebe-Hoffmann U, Engel H, Göhring UJ et al. Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro. *Cytokine.* 2003; 23(4-5):119-25.
- Sacks GP, Scott D, Tivnann H, Mire-Sluis T, Sargent IL, Redman CW. Interleukin-12 and pre-eclampsia. *J Reprod Immunol.* 1997;34(2):155-8.
- Sado T, Naruse K, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Tanase Y, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Inflammatory pattern recognition receptors and their ligands: factors contributing to the pathogenesis of preeclampsia. *Inflamm Res.* 2011; 60(6):509-20.
- Sakai M, Tsuda H, Tanebe K, Sasaki Y, Saito S. Interleukin-12 secretion by peripheral blood mononuclear cells is decreased in normal pregnant subjects and increased in preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol.* 2002; 47(2):91-7.
- Schaaf B, Luitjens K, Goldmann T, van Bremen T, Sayk F, Dodt C, Dalhoff K, Droemann D. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagn Pathol.* 2009; 16 (4):1-7.
- Sharma A; Satyam A; Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF- α , IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58(1): 21-30.
- Sharma D, Singh A, Trivedi SS, Bhattacharjee J. Role of endothelin and inflammatory cytokines in pre-eclampsia - A pilot North Indian study. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 65(4):428-32.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005; 365(9461):785-99.

- 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(10):1110-6.
- Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol*. 2010; 11:59.
- Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Okira S, Konishi I. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch* 2004; 444(1): 49-55.
- Tinsley JH, South S, Chiasson VL, Mitchell BM. Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats. *Am J Physiol* 2010; 298(3):R713-9.
- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi, J-marc. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis and management. *Vascular Health And Risk Management*. 2011; 7:467-74.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem*. 2002; 277(17):15107-12.
- Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol*. 2009; 27:693-733.
- van Nieuwenhoven ALV, Moes H, Heineman MJ, Santema J, Faas MM. Cytokine Production by Monocytes, NK Cells, and Lymphocytes Is Different in Preeclamptic Patients as Compared with Normal Pregnant Women. *Hypertension in Pregnancy*. 2008; 27(3): 207–24.
- Virca GD, Kim SY, Glaser KB, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide induces hyporesponsiveness to its own action in RAW 264.7 cells. *J Biol Chem*. 1989; 264(36): 21951-6.
- Visser N, van Rijn BB, Rijkers GT, Franx A, Bruinse HW. Inflammatory changes in preeclampsia: current understanding of the maternal innate and adaptive immune response. *Obstet Gynecol Surv*. 2007; 62(3):191-201.
- van der Merwe JL, Hall DR, Wright C, Schubert P, Grové D. Are early and late preeclampsia distinct subclasses of the disease--what does the placenta reveal? *Hypertens Pregnancy*. 2010; 29(4):457-67.
- von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003; 22(2):143-8.

- Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14(5):361-8.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14(7): 353-6.
- Williams JH, Ireland HE. Sensing danger--Hsp72 and HMGB1 as candidate signals. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(3):489-92.
- Xia G, Xu D, Wu M, Wu C. Expression of Toll-like receptor 4 in neonatal cord blood mononuclear cells in patients with preeclampsia. *J Huazhong univ Sci Technolog Med Sci.* 2010; 30(5):615-9.
- Xie F, Hu Y, Turvey SE, Magee LA, Brunham RM, Choi KC, Kraiden M, Leung PC, Money DM, Patrick DM, Thomas E, von Dadelszen P. Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and preeclampsia. *BJOG* 2010; 117(1):99-108.
- Xie F, Turvey SE, Williams MA, Mor G, von Dadelszen P. Toll-like receptor signaling and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2010a; 63(1):7-16.



CAPÍTULO II

**DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES CELULARES NO
PLASMA DE GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPسيا**

**Cell biomarkers determination in plasma of pregnant women with
preeclampsia**

Mariana Romão¹; Ingrid Cristina Weel¹; Maria Terezinha Serrão Peraçoli²; Steven Sol Witkin³.

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

² Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, CEP 18618-970.

³ Departamento de Obstetrícia e Ginecologia – Weill Medical College of Cornell University, New York, NY, United States of America, 10021

RESUMO

Introdução e objetivos: A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação clinicamente identificada por hipertensão e proteinúria a partir da 20^a semana de gestação. Na PE ocorre uma resposta inflamatória sistêmica, envolvendo células, produtos do estresse oxidativo e citocinas responsáveis pela manutenção de um ambiente pró-inflamatório, de maior intensidade do que o observado na gestação normal. Componentes celulares presentes no plasma, derivados de proteínas, polissacarídeos e lipídeos tem sido descritos como importantes moduladores da resposta inflamatória. Formas solúveis desses componentes, tais como histonas e gelsolina podem inibir a produção de citocinas inflamatórias induzida por lipopolissacáride (LPS) e outros fatores endógenos liberados por células mortas. Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar os níveis plasmáticos de indutor de metaloproteinase da matriz extracelular (EMMPRIN), hialuronan, histona 2B (H2B), visfatina e gelsolina em gestantes normotensas e em portadoras de PE. **Métodos:** Foram estudadas 52 gestantes portadoras de PE e 40 gestantes normotensas, pareadas pela idade gestacional. A concentração desses biomarcadores foi determinada no plasma dessas gestantes por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram analisados por testes não paramétricos, com nível de significância de 5%. **Resultados:** Os resultados mostraram valores significativamente aumentados de EMMPRIN, visfatina e hialuronan no plasma de gestantes pré-eclâmpicas em comparação com as gestantes normotensas. Quando as gestantes portadoras de PE foram estratificadas em PE leve e grave, verificou-se que os níveis da visfatina foram significativamente mais elevados nas gestantes com PE leve em comparação às normotensas, enquanto a concentração de hialuronan foi mais elevada na PE grave do que nas gestantes com PE leve. Por outro lado, os níveis plasmáticos de gelsolina foram mais elevados em gestantes normotensas do que nas portadoras de PE. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados em relação à histona H2B. **Conclusão:** Em conjunto, os resultados do presente trabalho apontam para o papel desses biomarcadores celulares na modulação da resposta inflamatória observada na PE.

Palavras chave: pré-eclâmpsia, EMMPRIN, visfatina, hialuronan, histona H2B e gelsolina.

ABSTRACT

Introduction and objectives: Preeclampsia (PE) is a specific syndrome of pregnancy clinically identified by hypertension and proteinuria from the 20th week of gestation. PE occurs in a systemic inflammatory response involving cells, products of oxidative stress and cytokines responsible for maintaining a pro-inflammatory environment of higher intensity than that observed in normal pregnancy. Cellular components present in plasma derived from proteins, polysaccharides and lipids have been described as important modulators of the inflammatory response. Soluble forms of these components, such as histones and gelsolin can inhibit the production of inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide (LPS) and other endogenous factors released by dead cells. This study aimed to evaluate and compare the plasma levels of metalloproteinase inducer of extracellular matrix (EMMPRIN), visfatin, hyaluronan, histone 2B (H2B) and gelsolin in normotensive pregnant women and in patients with PE. **Methods:** We studied 52 pregnant women with PE and 40 normotensive pregnant women paired by gestational age. The concentration of biomarkers was determined in plasma of the both groups of pregnant women by enzyme immunoassay (ELISA). The results were analyzed by nonparametric tests, with a significance level of 5%. **Results:** Results showed significantly increased levels of EMMPRIN, visfatin and hyaluronan in the plasma of preeclamptic pregnant women compared to normotensive pregnant women. Preeclamptic women classification in mild and severe PE showed significantly higher levels of visfatin in women with mild PE compared with normotensive pregnant women, whereas hyaluronan concentration was higher in severe PE than in mild PE. On the other hand, plasma levels of gelsolin were higher in NT pregnant women than in pregnant women with PE. There was no significant difference between groups in relation to histone H2B. **Conclusion:** Taken together, the results of the present study point to the role of these cell biomarkers in the cellular modulation of the systemic inflammatory response observed in PE.

Keywords: preeclampsia, EMMPRIN, visfatin, hyaluronan, histone H2B and gelsolin.

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez humana que incide entre 3% e 8% das gestações (Carty et al., 2010; Uzan et al., 2011). É uma doença sistêmica, caracterizada por múltiplas alterações no organismo materno (Wegmann *et al.*, 1993) e clinicamente identificada pela manifestação, na segunda metade da gestação, de hipertensão arterial e proteinúria (Rein et al., 2003; Paternoster et al., 2004). A PE é classificada em leve e grave, de acordo com manifestações clínicas e laboratoriais apresentadas pelas gestantes (ACOG, 2002).

Embora a PE seja uma doença ainda sem etiologia claramente definida, a literatura sugere a interação de vários mecanismos na caracterização multissistêmica da doença, tais como: placentação inadequada (Pijnenborg et al., 1983), disfunção endotelial (Khan et al., 2005), má adaptação imunológica (Dekker & Sibai, 1999), estresse oxidativo (Gupta et al., 2005; Redman & Sargent, 2000; 2005) e resposta inflamatória excessiva (Redman & Sargent, 2003).

Assim, a PE resultaria da ativação exacerbada da resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias, como monócitos e granulócitos, bem como células endoteliais, que são parte do sistema inflamatório (Schuiling et al., 1997; Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006). É caracterizada por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Johnson et al., 2002; Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007) e quimiocinas (Visser 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; Visser et al., 2007; Peraçoli et al., 2008). Além disso, a PE compartilha também características da síndrome metabólica, incluindo resistência à insulina e obesidade (Sibai et al., 2005; Fasshauer et al., 2008).

As adipocinas desempenham importantes papéis no metabolismo. Entre elas, a visfatina, também conhecida como fator de estimulação de colônias de células pré- β (PBEF), é secretada principalmente pelo tecido adiposo visceral e pode atuar no desenvolvimento da obesidade associada à resistência à insulina (Fukuhara et al., 2005; Fasshauer et al., 2008). Em concentração dose-dependente, regula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e

fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por monócitos humanos (Moschen et al., 2007).

Componentes celulares presentes no plasma, derivados de proteínas, polissacarídeos e lipídeos, bem como produtos da matriz extracelular são considerados importantes moduladores da resposta inflamatória. O indutor de metaloproteinase da matriz extracelular (EMMPRIN), também conhecido como CD147, é uma proteína de membrana que se expressa em diferentes tipos celulares como células endoteliais e macrófagos. Possui diversas funções fisiológicas e se liga a uma grande variedade de moléculas, regulando o remodelamento de tecidos e a espermatogênese (Huet et al., 2008). A interação Ciclofilina A - EMMPRIN é uma das principais vias de sinalização pró-inflamatória em monócitos, especialmente na resposta à estimulação por espécies reativas do oxigênio (ROS) (Yuan et al., 2010).

Segundo a literatura, as histonas, identificadas como proteínas nucleares que se associam com o DNA, estão presentes no citoplasma e no fluido extracelular, onde atuam como agentes antimicrobianos, principalmente a histona H2B (Kawasaki & Iwamuro, 2008; Witkin et al., 2010). Kim et al. (2002) demonstraram em membrana amniótica que as histonas H2A e H2B se ligam ao LPS bloqueando seus efeitos biológicos. A H2B pode ser encontrada na superfície de monócitos e macrófagos (Holers & Kotzin, 1985), atuando como importante receptor para plasminogênio (Das et al., 2007) e exercendo função quimiotáticas para células inflamatórias (Ploplis et al., 1998). Não existem evidências de que infecções estejam envolvidas na etiologia da PE, embora baixas doses de LPS administradas a ratas durante a prenhez induzem PE experimental (Faas et al., 1994). Nesse sentido, a diminuição de fatores plasmáticos capazes de inibir o LPS pode influenciar na fisiopatologia da PE.

Células do sistema imune inato expressam receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) considerados componentes centrais do sistema imune inato e que estão envolvidos na resposta inflamatória de monócitos (Kim et al., 2005; Mazouni et al., 2008). Entre os vários PRRs a principal família é a dos receptores semelhantes ao *Toll* (TLRs), que reconhecem e ligam moléculas presentes na superfície de patógenos conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Koga & Mor, 2008), e contribuem para a defesa do hospedeiro contra infecções. Esses receptores também ligam

produtos endógenos de células do organismo, denominados “sinais de perigo”, que são liberados durante lesão tecidual (Matzinger, 2002; Kim et al., 2005). Entre estes produtos são identificados como moléculas tais como, reativos intermediários do oxigênio (Frantz et al., 2001), proteínas liberadas de células mortas (Park et al., 2004) e produtos liberados da matriz extracelular, como fibronectina (Okamura et al., 2001).

O ácido hialurônico ou hialuronan 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 TLR2 e TLR4, agindo como “sinais de perigo”, enquanto o Hialuronan de alto peso molecular gera resposta anti-inflamatória (Taylor et al., 2004; Scheibner et al., 2006; Stern et al., 2006).

A ativação de TLR, especialmente após ligação do complexo TLR4 com o LPS, resulta na ativação de células através da via de sinalização intracelular do fator NF- κ B (Lu et al., 2008), causando a translocação da subunidade p65 do NF- κ B para o núcleo, que resulta em produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 (Chow et al., 1999). O EMMPRIN também estimula a produção de citocinas inflamatórias através da via de ativação do NF- κ B (Reddy et al., 2010).

A Gelsolina é uma proteína encontrada tanto no plasma como no citoplasma celular (Sun et al., 1999) e está diretamente envolvida na quebra e remoção rápida de filamentos de actina liberados na corrente sanguínea por células mortas (Lee & Galbraith, 1992; Pedadda et al. 2012). É capaz de interagir com diversas moléculas pró-inflamatórias e bioativas como ácido lisofosfatídico, fator ativador de plaquetas e fibronectina, que atuam como mediadores de várias funções fisiológicas (Lind & Janmey 1984; Osborn et al. 2007). Essa proteína também se liga fortemente a LPS e ácido lipoteicóico, comprometendo a capacidade dessas moléculas em mediar a resposta imune inata e inibindo a atividade de despolimerização de filamentos de actina (Bucki et al., 2005; 2008).

Na PE não há estudos, até o momento, envolvendo a participação da gelsolina na resposta inflamatória sistêmica observada nessa patologia gestacional. Assim, a determinação dessa proteína no plasma de gestantes com PE poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune dessa doença.

Há anos, investigam-se possíveis marcadores biofísicos e bioquímicos com objetivo de melhorar a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na PE (Baumann et al., 2007; Grill et al., 2009). Assim, a busca por biomarcadores sanguíneos ou urinários, capazes de predizer o desenvolvimento ou auxiliar na detecção precoce da PE torna-se de extrema importância (Grill et al., 2009).

2. OBJETIVOS

Determinar os níveis plasmáticos de EMMPRIN, visfatina, hialuronan, histona 2B e gelsolina em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, comparando-os com os de gestantes normotensas.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

3.1. Sujeitos

Foram estudadas 52 gestantes portadoras de PE e 40 gestantes normotensas, que receberam assistência médica na maternidade do Hospital das Clínicas da Weill Cornell Medical College, New York, USA.

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

As gestantes foram consideradas portadoras de PE quando, sem antecedente, manifestaram hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg) associada à proteinúria (≥ 300 mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20ª semana de gestação (NHBPEP, 2000).

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Weill Cornell Medical College, New York, USA.

3.2. Critérios de inclusão

Gestantes: ter gestação única e idade gestacional entre 24 e 40 semanas.

3.3. Critérios de exclusão

Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de pré-eclâmpsia (hipertensão arterial crônica, diabetes, cardiopatias, doenças renais, doenças infecciosas, soro positividade para HIV e má-formação fetal), ser usuária de drogas e/ou álcool ou não ter a gestação resolvida no Hospital das Clínicas da Weill Cornell Medical College, New York, USA.

3.4. Colheita de sangue

No momento do diagnóstico da PE foram coletados 10 mL de sangue por punção venosa. A amostra de sangue de gestantes normotensas foi coletada no momento em que foram pareadas pela idade gestacional com as gestantes pré-eclâmpticas.

3.5. Determinação EMMPRIN, visfatina e hialuronan

Para quantificação plasmática dos biomarcadores celulares EMMPRIN, visfatina e hialuronan empregaram-se kits comerciais específicos (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). As reações foram desenvolvidas segundo as instruções do fabricante e descritas conforme a técnica abaixo.

Placas de 96 orifícios e fundo plano (MaxiSorp-Nunc Life Tech. Inc., Maryland, MA, USA) foram sensibilizadas por 18 h a 5°C com anticorpo monoclonal específico anti-EMMPRIN, anti-visfatina e anti-hialuronan, diluídos em solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 (PBS). Após esse período os orifícios foram lavados três vezes com 300 µL de PBS, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). Para o bloqueio da placa foi adicionado, em cada orifício, 300 µL de PBS + soro albumina bovina (BSA-Sigma) 1%, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 60 min. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito anteriormente e 100 µL dos plasmas das gestantes e dos biomarcadores padrão (EMMPRIN, visfatina e hialuronan) foram adicionados aos orifícios das placas. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente e nova lavagem da placa adicionou-se o anticorpo revelador policlonal anti-EMMPRIN, anti-visfatina e anti-hialuronan marcados com biotina, seguindo-se de incubação por 2 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionados 100 µL de estreptoavidina conjugada com

peroxidase, na concentração de 2 µg/mL por 20 min a 37°C, seguido pela lavagem da placa com PBST. Após esse período, foram adicionados 100 µL do substrato enzimático, constituído por soluções estabilizadoras de peróxido de hidrogênio e de tetrametilbenzidina (DY999, R&D Systems). As placas foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 20 min e a reação foi bloqueada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2M. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland) com comprimento de onda de 450 nm. As concentrações dos biomarcadores presentes no plasma das gestantes normotensas e pré-eclâmicas foram calculadas a partir das curvas-padrão realizadas com os diferentes biomarcadores. Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonais e policlonais, bem como dos biomarcadores específicos, utilizados nas curvas-padrão, foram aquelas recomendadas pelo fabricante.

3.6. Determinação de gelsolina e histona H2B

As concentrações dos biomarcadores celulares gelsolina e histona H2B foram determinadas pela sua ligação com LPS por ELISA, conforme técnica descrita abaixo.

Placas de 96 orifícios e fundo plano (MaxiSorp-Nunc Life Tech. Inc., Maryland, MA, USA) foram sensibilizadas por 18 h a 5°C com 100 µL em concentração de 30 µL/mL de LPS de *Escherichia coli* (Sigma, St. Louis, MO), em solução tampão de carbonato de sódio, pH 10. Após esse período os orifícios foram lavados três vezes com 300 µL de PBS, pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). A seguir 100 µL dos plasmas diluídos 1:4 em PBST e dos biomarcadores padrão gelsolina e histona H2B foram adicionados aos orifícios das placas. Após 60 min de incubação à temperatura ambiente e nova lavagem da placa, foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-gelsolina ou anti-histona H2B, diluído em PBST, seguido de incubação por 60 min à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionados 100 µL de anticorpo policlonal de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (diluído 1:500 em PBST) (KPL Laboratories, Gaithersburg, MD), por 60 min em temperatura ambiente, seguido pela lavagem da placa com PBST. Após esse período foram adicionados 100 µL do substrato enzimático, constituído por soluções estabilizadoras de peróxido de hidrogênio e de tetrametilbenzidina (DY999, R&D

Systems). As placas foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 30 min e a reação foi bloqueada pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 2 M. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 450nm.

3.7. Análise Estatística

Os resultados obtidos pela determinação dos biomarcadores celulares no plasma de gestantes com PE e gestantes normotensas foram avaliados empregando-se análise de variância não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis ou teste U de Mann-Whitney). Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico INSTAT, GraphPad, San Diego, CA, USA (2000), com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Características dos grupos estudados

Na Tabela 1 observam-se as características clínicas das gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e gestantes normotensas. Não houve diferença estatística entre idade materna e idade gestacional entre os grupos avaliados. As pressões arteriais, sistólica e diastólica, foram significativamente maiores nos grupos de gestantes com PE em comparação às normotensas, e no grupo de gestantes com PE grave quando comparado com o grupo de gestantes com PE leve. Entre os grupos de gestantes pré-eclâmpicas o valor da proteinúria foram significativamente maior na PE grave.

Tabela 1. Características das gestantes normotensas e portadoras de pré-eclâmpsia.

Parâmetros	Normotensas	Pré-eclâmpsia (PE)	PE Leve	PE Grave
Idade materna (anos)	30 (20 – 42)	33 (24 – 42)	33 (24 – 42)	36 (24 – 42)
Idade gestacional (semanas)	36 (25 – 41)	37 (24 – 40)	38 (31 – 40)	36 (24 – 38)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	119 (102 – 136)	157 * (132 – 189)	150 * (132 – 168)	170 * # (146 – 189)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	70 (59 – 85)	100 * (77 – 133)	96 * (81 – 110)	105 * # (91 – 133)
Proteinúria (mg/24h)	<300	730 (300 – 3.320)	570 (300 – 1150)	1180 @ (333 – 3320)

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

* (p < 0,001) vs gestantes normotensas; # (p<0,001) vs gestantes com PE Leve; @ (p<0,05) vs gestante com PE Leve (teste de Kruskal-Wallis).

4.2. Concentração de biomarcadores celulares no plasma de gestantes normotensas e gestantes com PE

Na Tabela 2 estão representadas as concentrações plasmáticas dos biomarcadores EMMPRIN, visfatina, hialuronan e histona H2B.

EMMPRIN, visfatina e hialuronan apresentaram níveis significativamente maiores no plasma de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia quando comparadas com gestantes normotensas. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados com relação à histona H2B. A análise de correlação entre esses parâmetros mostrou correlação positiva entre os valores de EMMPRIN e

visfatina nos grupos de gestantes com PE ($r=0,3455$; $p=0,0064$) e gestantes normotensas ($r=0,6214$; $p=0,0134$).

Tabela 2. Concentrações de biomarcadores celulares plasmáticos de gestantes normotensas e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

Parâmetros	Normotensas (n = 40)	Pré-eclâmpsia (n = 52)	Significância*
EMMPRIN (ng/mL)	17,2 (5,6 – 39,4)	36,9 (5,6 – 66,8)	$p < 0,001$
Visfatina (µg/mL)	5,7 (3,6 – 9,8)	7,9 (4,1 – 84,7)	$p < 0,05$
Hialuronan (µg/mL)	29,5 (4,8 – 108,2)	74,5 (12,6 – 490,2)	$p < 0,001$
Histona 2B (ng/mL)	6,9 (3,8 – 44,0)	7,8 (3,2 – 44,1)	NS

* Teste *U* de Mann-Whitney

4.3. Avaliação de gelsolina no plasma

A Figura 1 representa as densidades óticas obtidas na determinação de gelsolina no plasma de gestantes portadoras de PE e de gestantes normotensas. Níveis significativamente ($p<0,05$) maiores de gelsolina foram observados no plasma de gestantes normotensas em comparação às gestantes com PE.

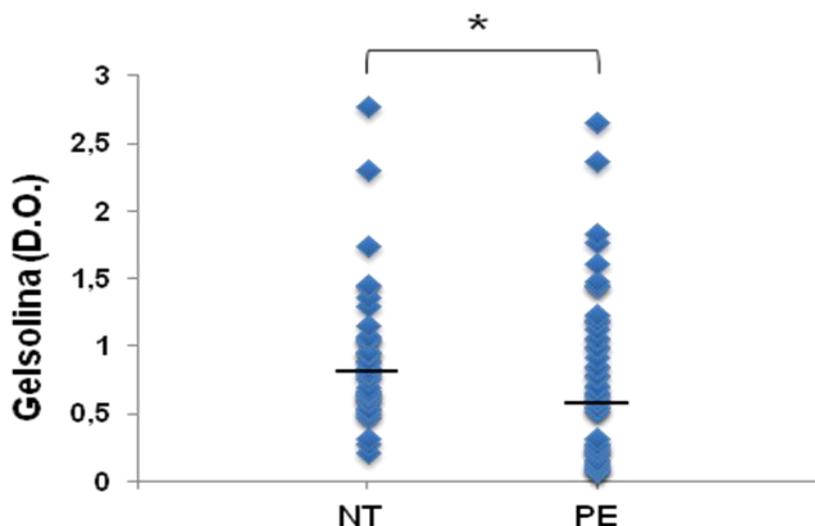


Figura 1. Nível de gelsolina no plasma de gestantes normotensas (NT) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE). Os resultados estão expressos em mediana da densidade óptica obtida. * ($p < 0,05$) – teste *U* de Mann-Whitney.

4.4. Concentração de biomarcadores celulares plasmáticos de gestantes normotensas e de gestantes com PE, classificadas em PE Leve e PE Grave

EMMPRIN (Figura 2A) e visfatina (Figura 2B) apresentaram níveis significativamente maiores no plasma de gestantes portadoras de PE quando comparadas com gestantes normotensas. Quando o grupo PE foi separado em PE leve e PE grave as concentrações EMMPRIM foram maiores nesses grupos em relação ao grupo de gestantes normotensas, não havendo diferença significativa entre PE leve e PE grave. Com relação à visfatina, o grupo de PE leve apresentou valores significativamente maiores do que as gestantes normotensas. Porém, a concentração plasmática verificada no grupo PE grave foi semelhante à do grupo de gestantes normotensas.

Os níveis de hialuronan (Figura 2C) foram significativamente maiores no plasma de gestantes portadoras de PE e, quando estas foram separadas nos grupos PE leve e PE grave em relação ao grupo de gestantes normotensas, independente da sua classificação em PE leve e PE grave. A comparação entre PE leve e PE grave mostrou diferença significativa, com valores maiores na PE grave.

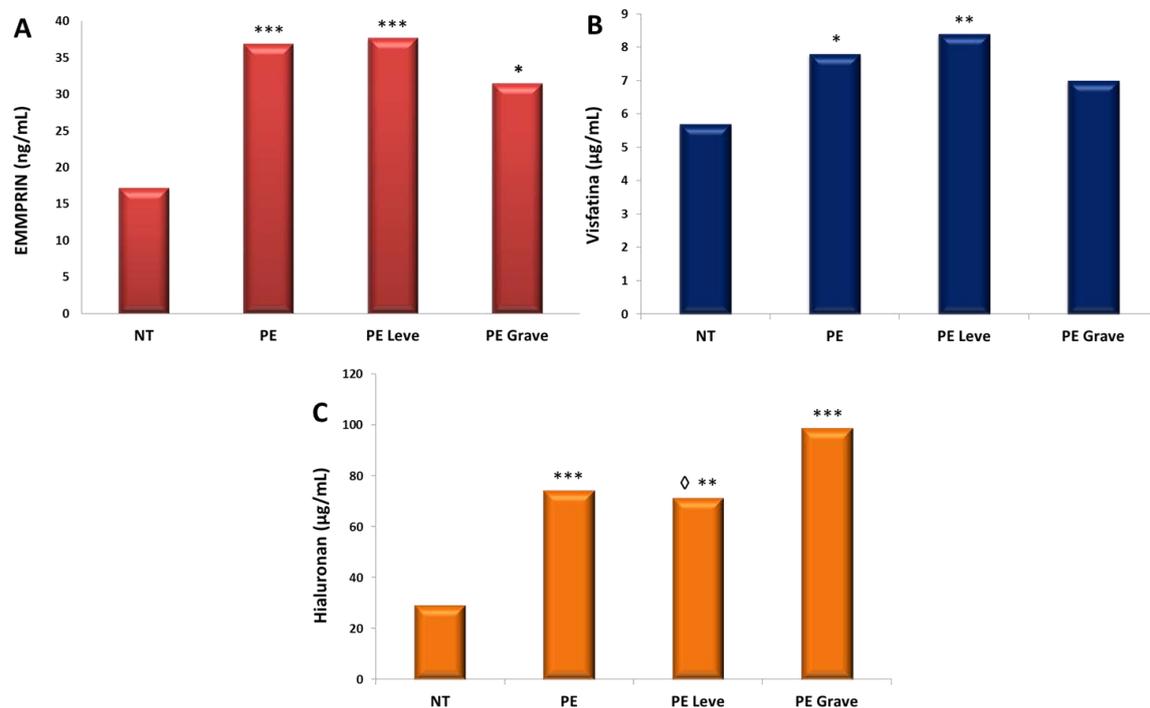


Figura 2. Concentração de EMMPRIN (A), Visfatina (B) e Hialuronan (C) em plasma de gestantes normotensas (NT), gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes portadoras de PE leve e de PE grave. Resultados expressos em mediana. * ($p < 0,05$) vs. NT; ** ($p < 0,01$) vs. NT; *** ($p < 0,001$) vs. NT; \diamond ($p < 0,05$) vs. PE Grave (teste de Kruskal-Wallis).

A concentração da histona H2B não apresentou diferença significativa entre gestantes normotensas e portadoras de PE, mesmo quando o grupo PE foi separado em PE leve e PE grave (Figura 3A).

A concentração de gelsolina foi significativamente maior no plasma de gestantes portadoras de PE quando comparadas com gestantes normotensas. O grupo de PE leve apresentou resultados semelhantes ao grupo normotensa, enquanto no grupo PE grave os valores de gelsolina foram significativamente menores em relação aos grupos de gestantes normotensas e de PE leve (figura 3B).

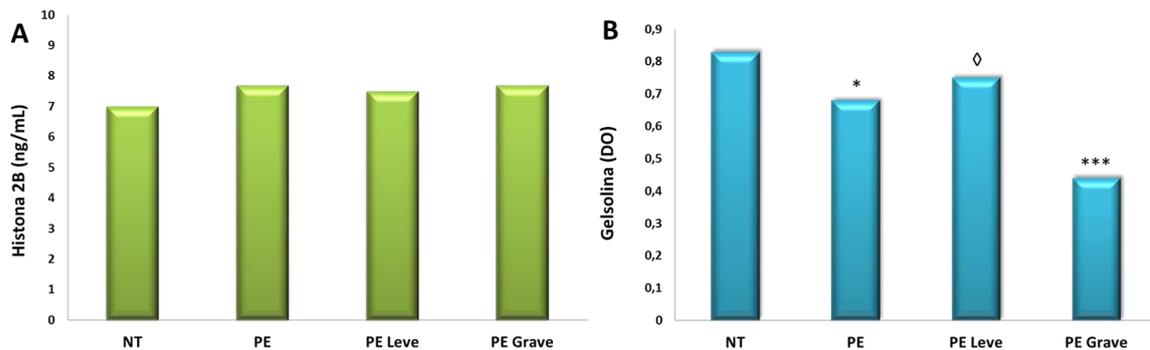


Figura 3. Concentração de Histona H2B (A) e Gelsolina (B) em plasma de gestantes normotensas (NT), gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), gestantes portadoras de PE leve de PE grave. Resultados expressos em mediana.

* ($p < 0,05$) vs. NT; *** ($p < 0,001$) vs. NT; ◇ ($p < 0,05$) vs. PE Grave (teste de Kruskal-Wallis).

5. DISCUSSÃO

A determinação da concentração de biomarcadores celulares no plasma de gestantes normotensas e com PE demonstrou maiores níveis de EMMPRIN, hialuronan e visfatina em gestantes com PE e maior nível de gelsolina em gestantes normotensas.

O EMMPRIN estimula a produção de citocinas inflamatórias através da via de ativação do NF- κ B (Reddy et al., 2010). Em trabalhos realizados em nosso laboratório, Peraçoli et al. (2011) mostraram que, monócitos de gestantes com PE liberam níveis significativamente maiores de TNF- α , ânion superóxido e peróxido de hidrogênio em comparação a gestantes normotensas. O grupo encontrou aumento da ativação de NF- κ B em células mononucleares de sangue periférico de mulheres pré-eclâmplicas, associado à maior produção de TNF- α e IL-1 β (Giorgi et al., 2012). Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo e o estado inflamatório são característicos dessa patologia da gestação.

A interação Ciclofilina A - EMMPRIN é uma das principais vias de sinalização pró-inflamatorias em monócitos, especialmente na resposta à estimulação por reativos intermediários do oxigênio (ROS) (Yuan et al., 2010). No presente trabalho observou-se correlação positiva entre os valores de EMMPRIN e visfatina nos dois grupos de gestantes estudados. Porém, quando o grupo PE

foi diferenciado em PE leve e PE grave observou-se uma tendência de maior concentração de EMMPRIN no grupo PE leve, provavelmente devido ao estímulo por visfatina, pois esse biomarcador pode, em concentração dose dependente, estimular o EMMPRIN e metaloproteinases (MMP-9) (Fan et al., 2011). Os maiores níveis de EMMPRIN no plasma de gestantes com PE demonstram que esse marcador deve estar diretamente envolvido na fisiopatologia da PE.

Os níveis de visfatina encontrados no plasma de gestantes com PE foram significativamente maiores que os das gestantes normotensas, o que está em acordo com a literatura (Fasshauer et al. 2008; Zulfikaroglu et al., 2010). Fasshauer et al. (2008) consideram a PE como uma complicação cardiovascular da gestação e que compartilha fatores de risco com síndrome metabólica como resistência à insulina e obesidade, observadas em algumas gestantes pré-eclâmpicas. Os níveis elevados de visfatina observados por esses autores e em nosso trabalho podem estar associados com a síndrome metabólica. Verificou-se ainda em nosso trabalho uma tendência a maior nível de visfatina no grupo PE leve. A razão pela qual a visfatina está aumentada na PE ainda não está esclarecida, havendo dúvidas se decorre do aumento de síntese ou pela diminuição da degradação, mas acredita-se que esse marcador possa contribuir para a patogênese da pré-eclâmpsia.

A concentração de hialuronan no plasma foi significativamente maior nas gestantes com PE, principalmente no grupo com PE grave, cujos valores também foram significativamente maiores que os da PE leve. Esses resultados concordam com Berg et al. (2001), que avaliaram gestantes com eclâmpsia e pré-eclâmpsia grave. O nível plasmático de hialuronan em humanos normais é baixo devido à sua rápida remoção da circulação pelo fígado e rins (Fraser et al., 1997). Entretanto, em algumas doenças o hialuronan é degradado por hialuronidases e espécies reativas de oxigênio, estimulando a produção de fragmentos de baixo peso molecular (Girish & Kemparaju, 2007). Esses fragmentos ativam a resposta pró-inflamatória via TLR2 e TLR4, indicando sinais de perigo, enquanto o hialuronan de alto peso molecular gera resposta anti-inflamatória (Taylor et al., 2004; Scheibner et al., 2006; Stern et al., 2006). Como na PE há disfunção hepática e lesão renal, o aumento do nível de hialuronan pode ser um marcador dessas disfunções.

Nossos resultados demonstraram que não há diferença entre os níveis plasmáticos de histona H2B entre gestantes portadoras de PE e gestantes normotensas, mesmo quando o grupo PE foi separado em PE leve e PE grave. A H2B é encontrada na superfície de monócitos e macrófagos (Holers & Kotzin, 1985), atuando como importante receptor para plasminogênio (Das et al., 2007) e apresentando funções quimiotáticas para células inflamatórias (Ploplis et al., 1998). Kim et al. (2002) demonstraram em membrana amniótica que as histonas H2A e H2B se ligam ao LPS bloqueando seus efeitos biológicos, atuando como uma barreira contra os microrganismos que invadem a cavidade uterina.

Estudos demonstraram que a gelsolina está diminuída em pacientes portadores de doenças como artrite reumatoide, esclerose múltipla, pneumonia, entre outras. Pacientes com níveis reduzidos de gelsolina plasmática apresentam altas taxas de mortalidade, maior tempo de internação e necessidade de ventilação em unidade de terapia intensiva, sugerindo-se que seria um importante marcador de saúde. Entretanto, há necessidade de se estabelecer o nível de acurácia desse marcador no plasma humano, bem como sua variação com idade, raça, gênero e estado de saúde (Peddada et al., 2012).

O menor nível de gelsolina detectado em gestantes pré-eclâmpicas, principalmente no grupo com PE grave, pode estar associado à capacidade de ligação da gelsolina com o fator ativador de plaquetas, o que inibiria a expressão de P-selectina assim como a produção de ânion superóxido por neutrófilos (Osborn et al., 2007), na tentativa de regular o estado inflamatório presente na PE. Assim, pode também estar associado à ligação com fibronectina (Lind & Janmey, 1984), uma vez que a concentração de fibronectina está aumentada em gestantes com PE, acreditando ser esta um marcador de predição da doença (Chen et al., 1994; Leeflang et al., 2007).

Em conjunto, os resultados do presente trabalho indicam a importância de biomarcadores celulares plasmáticos, como EMMPRIN, visfatina, hialuronan e gelsolina na modulação do processo inflamatório presente na pré-eclâmpsia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin no. 33. Washington, DC.: ACOG; 2002.
- Baumann MU, Bersinger NA, Surbek DV. Serum markers for predicting pre-eclampsia. *Mol Asp Med*. 2007; 28(2):227-44.
- 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(2):131-7.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11(5):309-16.
- Bucki R, Georges PC, Espinassous Q, Funaki M, Pastore JJ, Chaby R, Janmey PA. Inactivation of endotoxin by human plasma gelsolin. *Biochemistry*. 2005; 44(28): 9590–7.
- Bucki R, Byfield FJ, Kulakowska A, McCormick ME, Drozdowski W, Namiot Z, Hartung T, Janmey PA. Extracellular gelsolin binds lipoteichoic acid and modulates cellular response to proinflammatory bacterial wall components. *J Immunol*. 2008; 181(7):4936-44.
- 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(4):480-90.
- Carty DM, Delles C, Dominiczak AF. Preeclampsia and future maternal health. *J Hypertens*. 2010; 28(7): 1349-55.
- Chen CK, Lee CN, Shyu MK, Hwa HL, Chen CD, Sheu BC, Hsieh FJ. Fibronectin levels in normal pregnancy and preeclampsia. *J Formos Med Assoc*. 1994; 93(11-12):921-4.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 1999; 274(16):10689-92.
- Das R, Burke T, Plow EF. Histone H2B as a functionally important plasminogen receptor on macrophages. *Blood*. 2007;110(10):3763-72.
- Dekker GA, Sibai BM. The immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol*. 1999; 23(1):24-33.
- Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in perinatology*. 2009; 33(3): 130-7.

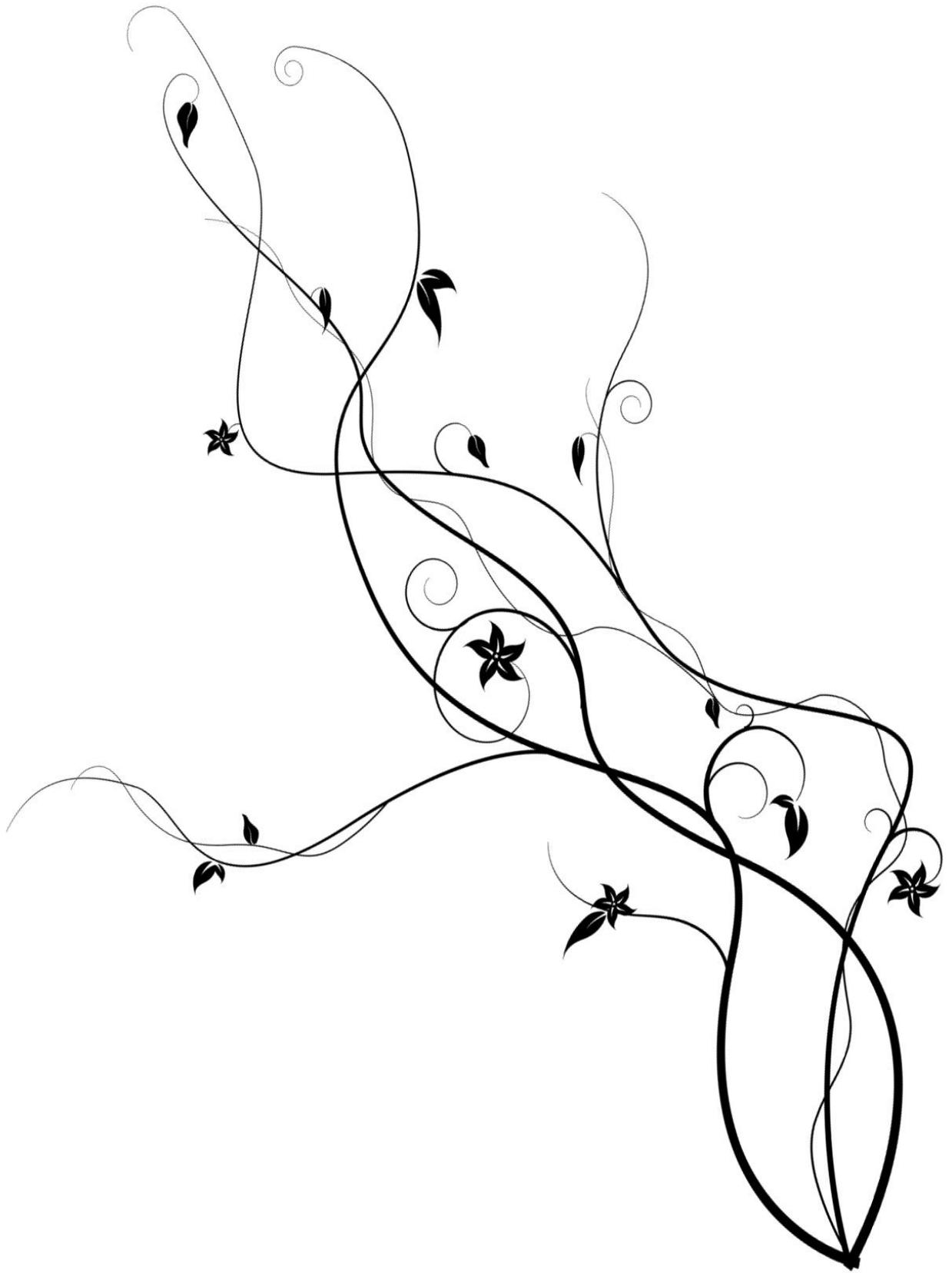
- Elsheikh A, Creatsas G, Mastorakos G, Milingos S, Loutradis D, Michalas S. The renin-aldosterone system during normal and hypertensive pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2001; 264(4):182-5.
- Erskine KJ, Iversen SA, Davies R. An altered ratio of 18:2 (9,11) to 18:2 (9,12) linoleic acid in plasma phospholipids as a possible predictor of pre-eclampsia. *Lancet* 1985;1(8428):554-5.
- Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Visscher CA, Bakker WW. A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 171(1):158-64.
- Fan Y, Meng S, Wang Y, Cao J, Wang C. Visfatin/PBEF/Nampt induces EMMPRIN and MMP-9 production in macrophages via the NAMPT-MAPK (p38, ERK1/2)-NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2011; 27(4):607-15.
- Fasshauer M, Waldeyer T, Seeger J, Schrey S, Ebert T, Kratzsch J, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Faber R, Stepan H. Serum levels of the adipokine visfatin are increased in pre-eclampsia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008; 69(1):69-73.
- Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappa B by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276(7):5197-203.
- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997; 242(1):27-33.
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307(5708): 426–30.
- Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF- κ B pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol.* 2012; 95 (1-2):67-72.
- Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci* 2007; 80(21):1921-43.
- Grill S, Rusterholz C, Zanetti-dällenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, Lapaire O. Potential markers of preeclampsia – a review. *Reprod Biol Endocr. Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7:70.
- Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv.* 2005; 60(12):807-16.

- Holers VM, Kotzin BL. Human peripheral blood monocytes display surface antigens recognized by monoclonal antinuclear antibodies. *J Clin Invest.* 1985; 76(3):991-8.
- Huet E, Gabison EE, Mourah S, Menashi S. Role of Emmprin/CD147 in Tissue Remodeling. *Connect Tissue Res.* 2008; 49(3):175-9.
- Johnson MR, Anim-Nyame N, Johnson P, Sooranna SR, Steer PJ. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction? *BJOG.* 2002;109(7):836-9.
- Kawasaki H, Iwamuro S. Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect Disord Drug Targets;* 2008; 8(3):195-205.
- Khan F, Belch JJ, MacLeod M, Mires G. Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops. *Hypertension.* 2005; 46(5):1123-8.
- Kharb S, Gulati N, Singh V, Singh GP. Superoxide anion formation and glutathione levels in patients with preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49(1):28-30.
- Kim HS, Cho JH, Park HW, Yoon H, Kim MS, Kim SC. Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. *J Immunol.* 2002;168(5):2356-64.
- Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, Armant DR, Nien JK, Gomez R, Mazor M, Saito S, Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193(3 Pt 2):921-7.
- Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2008; 15(3):231-42.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003; 9(5):525-32.
- Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med.* 2005; 11(6):653-60.
- Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med.* 1992; 326(20):1335-41.
- Leeflang MM, Clossen JS, van der Post JA, Mol BW, Khan KS, ter Riet G. Accuracy of fibronectin tests for the prediction of pre-eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 133(1):12-9.

- Lind SE, Janmey PA. Human plasma gelsolin binds to fibronectin. *J Biol Chem.* 1984; 259(21):13262-6.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42(2): 145-151.
- Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.* 2006; 118(2-3):268-75.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002; 296(5566):301-5.
- Mazouni C, Capo C, Ledu R, Honstettre A, Agostini A, Capelle M, Mege JL, Bretelle F. Preeclampsia: impaired inflammatory response mediated by Toll-like receptors. *J Reprod Immunol.* 2008; 78(1):80-3.
- Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol.* 2007;178(3):1748-58.
- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(1):S1-S22.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001; 276(13):10229-33.
- Osborn TM, Dahlgren C, Hartwig JH, Stossel TP. Modifications of cellular responses to lysophosphatidic acid (LPA) and platelet activating factor (PAF) by plasma gelsolin (pGSN). *Am. J. Physiol.* 2007; 292(4):1323-31.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004; 279(9):7370-7.
- Paternoster DM, Fantinato S, Manganelli F, Nicolini U, Milani M, Girolami A. Recent progress in the therapeutic management of pre-eclampsia. *Expert Opin Pharmacother.* 2004; 5(11):2233-9.
- Peddada N, Sagar A, Ashish, Garg R. Plasma gelsolin: A general prognostic marker for health. *Med Hypotheses.* 2012; 78(2):203-10.
- Peraçoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2007; 57(3):177-85.
- Peraçoli 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(1):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(6):460-7.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:929-79.
- Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta.* 1983; 4(4):397-413.
- Ploplis VA, French EL, Carmeliet P, Collen D, Plow EF. Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. *Blood.* 1998; 91(6):2005-9.
- Reddy VS, Prabhu SD, Mummidi S, Valente AJ, Venkatesan B, Shanmugam P, Delafontaine P, Chandrasekar B. Interleukin-18 induces EMMPRIN expression in primary cardiomyocytes via JNK/Sp1 signaling and MMP-9 in part via EMMPRIN and through AP-1 and NF-kappaB activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299(4):H1242-54.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180 (2 Pt 1):499-506.
- Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta.* 2000; 21(7):597-602.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta.* 2003; 24(suppl A):S21-S27.
- Redman CW; Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005; 308(5728):1592-4.
- Rein DT, Breidenbach M, Hönsheid B, Friebe-Hoffmann U, Engel H, Göhring UJ et al. Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro. *Cytokine.* 2003; 23(4-5):119-25.
- Robillard PY. Interest in preeclampsia for researchers in reproduction. *J Reprod Immunol.* 2002; 53(1-2):279-87.
- 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(2):1272-81.
- Schulling GA, Koiter TR, Faas MM. Why pre-eclampsia? *Hum Reprod.* 1997 Oct; 12(10):2087-91.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005; 365(9461):785-99.

- Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol.* 2006; 85(8):699-715.
- Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem.* 1999; 274(47):33179-82.
- Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Okira S, Konishi I. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch* 2004; 444(1): 49-55.
- 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(17):17079-84.
- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi, J-marc. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis and management. *Vascular Health And Risk Management.* 2011; 7:467-74.
- Visser N, van Rijn BB, Rijkers GT, Franx A, Bruinse HW. Inflammatory changes in preeclampsia: current understanding of the maternal innate and adaptive immune response. *Obstet Gynecol Surv.* 2007; 62(3):191-201.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today.* 1993; 14(7): 353-6.
- Witkin SS, Linhares IM, Bongiovanni AM, Herway C, Skupski D. Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy. *BJOG.* 2011; 118(2):145-53.
- Yuan W, Ge H, He B. Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes. *Atherosclerosis.* 2010; 213(2):415-21.
- Zulfikaroglu E, Isman F, Payasli A, Kilic S, Kucur M, Danisman N. Plasma visfatin levels in preeclamptic and normal pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2010; 281(6):995-8.



ANEXOS

Anexo 1



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

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



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 04 de julho de 2011.

Of. 277/11-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^ª. Dr^ª. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Departamento de Micro/Imuno do
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezada Dr^ª Terezinha,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa - (Protocolo CEP 3922-2011) "Associação entre a expressão de receptores TLR2 e TLR4, de fator de transcrição nuclear NF-kB e produção de IL-10, IL-12 e TNF-Alfa por monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia", de autoria de Mariana Romão, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada pelo Prof. Titular José Carlos Peraçoli, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de 04 de Julho de 2.011.

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

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ gestante, atendida no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, fui convidada a participar da pesquisa “**ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE RECEPTORES TLR2 E TLR4, DE FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NF-κB E PRODUÇÃO DE IL-10, IL-12 E TNF-ALFA POR MONÓCITOS DE GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPsia**”. Nesta pesquisa fui solicitada a doar pequena quantidade de sangue da veia do braço (10 mL), que será colhido com seringa e agulha descartáveis, uma única vez, no momento em que for atendida pelo médico. 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 benefício direto com a pesquisa, mas que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo. Também estou sabendo que 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) 3811-6143.

Botucatu, de _____ de 20__.

Assinatura do voluntário maior de 18 anos

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

Assinatura da gestante maior de 11 anos

Pesquisadores:

José Carlos Peraçoli – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Fone: (14) 3811-6227

Mariana Romão - Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

Telefone: (14) 3880-0431