**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**
**CÂMPUS DE BOTUCATU**

# Efeito da silibinina sobre o metabolismo oxidativo e produção de citocinas por monócitos em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

**Renata Cristofalo**

**Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada.**

**BOTUCATU**
**2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL*: Selma Maria de Jesus*

Cristofalo, Renata.
Efeito da Silibinina sobre o metabolismo oxidativo e produção de citocinas por monócitos em gestantes normais e portadoras de Pré-eclâmpsia / Renata Cristofalo. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.
Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Assunto CAPES: 20702051

1. Citocinas 2. Metabolismo 3. Agentes oxidantes

CDD 574.8761

Palavras-chave:Citocinas; Metabolismo oxidativo; Monócitos; Pré-eclâmpsia; Silibinina

*Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, com auxílio da Fundação de Amparo ã Pesquisa do Estado de São Paulo.*
*Processo nº. 06/54030-4 e 06/07095-3.*

# Lista de Abreviaturas

**BSA:** soro albunina bovina

**CD:** antígeno de diferenciação

**CPH:** complexo principal de histocompatibilidade

**$CO_2$:** gás carbônico

**$COX_2$:** ciclooxigenase

**CTLA:** antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico

**DO:** densidade óptica

**FoxP3:** “forkhead box P3”

**GM-CSF:** fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos

**GN:** grávidas normais

**HLA:** antígenos leucocitários humanos

**$H_2O_2$:** peróxido de hidrogênio

**ICAM 1:** molécula de adesão intercelular 1

**IDO:** indolamina 2,3-dioxigenase

**IL:** interleucina

**INF-$\gamma$**: interferon-gama

**LPS:** lipopolissacáride de *Escherichia coli*

**$\mu$L:** microlitro

**NF-kB:** fator nuclear kappa B

**NG:** não grávidas

**NK:** célula natural killer

**$O_2^-$:** ânion superóxido

**PBS:** solução salina tamponada com fosfatos

**$PGE_2$:** prostaglandina $E_2$

**PIGF:** fator de crescimento placentário

**PMA:** éster de forbol

**PMN:** polimorfonucleares

**RPMI:** meio de cultura celular

**SOD:** superóxido dismutase

**TGF-$\beta$1:** fator de crescimento e transformação

**Th:** célula T helper

**TNF-$\alpha$:** fator de necrose tumoral $\alpha$

**Treg:** célula T reguladora

**uNK:** célula natural killer uterina

**VEGF:** fator de crescimento endotelial vascular

# Sumário

# Sumário

**Capítulo I**
**Revisão da Literatura**
Imunologia da Pré-eclâmpsia..... **1**
**Referências Bibliográficas** **13**
**Capítulo II**
Efeito da Silibinina sobre o metabolismo oxidativo e produção de citocinas por monócitos em gestantes normais e portadoras de Pré-eclâmpsia.
**Resumo** ..... **27**
**Abstract**..... **29**
**Introdução**..... **31**
**Objetivos**..... **36**
**Delineamento Experimental**..... **37**
**Casuística e Métodos**..... **38**
Pacientes e controles ..... **38**
Critérios de exclusão..... **38**
Dosagem da proteinúria..... **38**
Isolamento e cultura de monócitos..... **39**
Obtenção de sobrenadante de cultura de monócitos..... **39**
Determinação das citocinas TNF-$\alpha$, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF e TGF-$\beta$1 pela técnica de ELISA..... **40**
Determinação de ânion superóxido..... **41**
Preparo do hemolisado de eritrócitos..... **42**
Dosagem de hemoglobina no hemolisado de eritrócitos..... **42**
Determinação de Superóxido Dismutase..... **42**
Análise Estatística..... **43**
**Resultados**..... **44**
Características das gestantes e mulheres não-grávidas..... **44**
Efeito da silibinina sobre a produção de ânion superóxido..... **45**
Atividade da Superóxido Dismutase em eritrócitos de mulheres normais não-grávidas, gestantes normais e gestantes portadoras de pré-eclâmpsia..... **47**
Produção de TNF-alfa..... **48**
Produção de IL-6..... **50**
Produção de IL-10..... **51**
Produção de IL-12..... **51**
Produção de IL-15..... **52**
Produção de GM-CSF..... **53**
Produção de TGF-$\beta$1..... **54**
**Discussão**..... **55**
**Conclusões** ..... **67**
**Referências Bibliográficas**..... **68**
**Anexo 1**..... **85**

# Capítulo I

## 1. Revisão da Literatura

### IMUNOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPSIA

### TOLERÂNCIA MATERNA AO ENXERTO FETO-PLACENTÁRIO

O desenvolvimento de tolerância imunológica mútua entre mãe e feto ocorre desde o inicio da gestação quando há interação dos antígenos paternos, presentes no enxerto fetal, com os tecidos maternos. Essa interação desencadeia alterações fisiológicas, que serão responsáveis pela adaptação do organismo materno à gestação, necessárias ao desenvolvimento do concepto e ao preparo para o parto e a lactação. Não há dúvida de que a tolerância materna ao enxerto feto-placentário é o resultado da integração de numerosos mecanismos de diferentes origens e modos de ação, que atuam em sinergismo, permitindo o sucesso da gestação (PERAÇOLI et al*.,* 2003).

A contribuição fetal é decisiva para o sucesso da gravidez. A interação mãe-feto envolve mecanismos semelhantes aos dos aloenxertos, induzindo alterações fisiológicas no organismo materno, denominadas no seu conjunto de adaptação do organismo materno à gravidez.

A tolerância do sistema imune materno ao semi-enxerto fetal é um mecanismo ativo, no qual os tecidos fetais não são reconhecidos como estranhos e/ou não são rejeitados pelas células do sistema imune materno (THELLIN et al., 2000).

Em trabalho clássico, WEGMANN et al. (1993) propuseram que na presença do antígeno fetal a resposta imune materna é desviada para uma resposta menos lesiva. Portanto, não há mais dúvida de que existe, na interface materno-fetal, uma resposta imune materna dirigida ao aloenxerto fetal; porém, o sistema de imunorregulação local permite o desenvolvimento do feto e o sucesso da gestação.

Para que a unidade feto-placentária seja aceita pela superfície uterina há necessidade do desenvolvimento de tolerância imunológica local. As células imunes, na decídua uterina, atuam como barreira física e imunológica ao desenvolvimento da placenta (KELEMEN et al., 1998). Alguns fatores da unidade feto-placentária estimulam a invasão do endométrio e miométrio, enquanto outros modificam a barreira imunológica. Durante a invasão e crescimento placentários a resposta imune materna é modificada por

antígenos fetais, citocinas, células como monócitos, linfócitos e hormônios presentes no trofoblasto, resultando em resposta complexa e equilibrada. O desencadeamento de reatividade adequada aos antígenos fetais permite o desenvolvimento e crescimento do feto, enquanto uma resposta anormal pode provocar a perda precoce da gravidez ou complicações tardias da mesma (PERAÇOLI et al., 2003).

Durante a implantação do embrião no útero, seus tecidos entrarão em contato direto com o sistema imune materno, podendo ocorrer ou não rejeição, na dependência da presença de antígenos paternos que serão reconhecidos pelo sistema imune materno. No local de implantação na decídua, as células do trofoblasto extraviloso interagem com uma variedade de leucócitos maternos.

Para manutenção da gravidez é importante que durante a implantação do trofoblasto haja controle, nos tecidos fetais, da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) de classe I (HLA-A, B, C) e classe II (HLA-DR, DP, DQ), responsáveis pelo fenômeno de rejeição imunológica. Essas moléculas de classe I e classe II do CPH participam da indução da resposta imune devido à apresentação de peptídeos antigênicos no contexto de moléculas de classe I para células T citotóxicas, enquanto as moléculas de classe II expõem os peptídos às células T *helper* (ABBAS et al., 2008). Portanto, o bloqueio ou a ausência de expressão das moléculas de classe I e II, nas células trofoblásticas, seria condição obrigatória para a tolerância materna e manutenção da gravidez (LENFANT et al., 1998).

Em humanos, células do sinciciotrofoblasto, que isolam os tecidos fetais dos tecidos maternos, não apresentam na membrana celular as moléculas clássicas CPH de classe II (HLA-DR) ou de classe I (HLA-A e HLA-B). Por outro lado, expressam um grupo particular de moléculas pertencentes ao CPH de classe I, com baixo polimorfismo, representadas por moléculas HLA-C, HLA-E e HLA-G, encontradas quase exclusivamente no sinciciotrofoblasto e codificadas por genes não polimórficos de classe I do CPH (KING et al., 2000). Essas moléculas são ligantes específicos de células *natural killer* (NK) uterinas (MOFFETT-KING, 2002) e sua presença nas células trofoblásticas exerce pelo menos duas funções imunológicas: inibir a atividade citotóxica das células NK

da decídua (MÜNZ et al., 1997) e não estimular algumas células T CD8+, que possuem atividade citotóxica (WEETMAN, 1999).

A decídua é infiltrada por células NK uterinas, macrófagos e células T CD3+. As células NK da decídua apresentam fenótipo $CD16^{-}CD56+$, com atividade lítica semelhante à de células NK circulantes (KING et al., 1998). Há evidências de que a atividade citotóxica de células NK da decídua ou do sangue periférico, contra células fetais ou do trofoblasto, seja regulada por sinais inibitórios, originados da interação com moléculas HLA-G (HUNT et al., 2005). Assim, a função efetora das células NK é regulada por uma série de receptores de ativação e inibição. Durante a interação materno-fetal, moléculas HLA-G, HLA-C e HLA-E, presentes nas células do trofoblasto, ligam-se ao receptor de inibição da célula NK presente na mesma, assim como o fazem outras moléculas de classe I. Essa interação parece bloquear a citotoxicidade dessas células (HUDDLESTON & SCHUST, 2004) e pode contribuir para a tolerância ao concepto, reduzindo a atividade da célula NK (CAROSELLA et al., 1999) (Figura 1). Portanto este é considerado um mecanismo de reconhecimento molecular das células trofoblásticas placentárias. As conseqüências funcionais dessa interação entre células NK uterinas e trofoblasto não estão bem estabelecidas. Provavelmente, as células NK secretam citocinas que modulam a tendência invasiva do trofoblasto extraviloso, limitando a placentação. Assim, a extensão da transformação vascular materna e a invasão trofoblástica podem ser reguladas (KING et al., 2000).

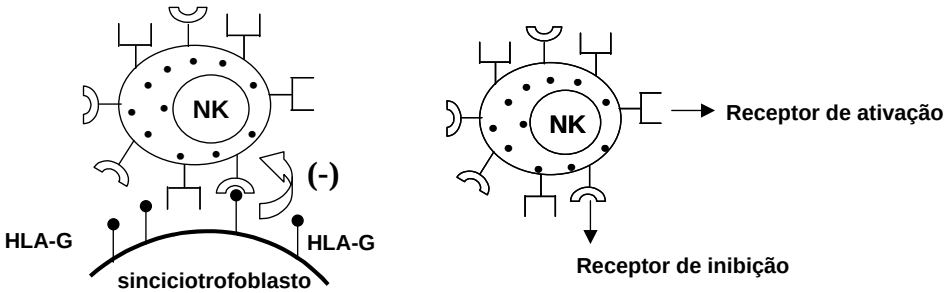



**Figura 1.** Reconhecimento de molécula HLA-G, presente em células trofoblásticas pela célula NK da decídua (PERAÇOLI et al., 2003).

As células NK uterinas destroem, preferencialmente, alvos celulares desprovidos ou com baixa expressão de moléculas HLA-G. Devido à expressão adequada dessas moléculas pelo trofoblasto extraviloso, células NK uterinas reconhecem os tecidos fetais como próprios, permitindo a invasão do trofoblasto, processo importante para o estabelecimento da placenta e seu suprimento sanguíneo (KING & LOKE, 1991). Portanto, parece que o contato direto de moléculas HLA-G, expressas no trofoblasto, com linfócitos e macrófagos maternos é essencial para o estabelecimento e manutenção da gravidez. O balanço adequado entre ativação e regulação das células NK da decídua, é fundamental no início da gestação, permitindo o crescimento da placenta e o desenvolvimento de gestação normal (PERAÇOLi et al., 2003).

Na gestação normal, além da tolerância das células NK por interação com moléculas CPH classe I, ocorre tolerância aos antígenos CPH classe II. Estes últimos não são expressos no trofoblasto extraviloso. Entretanto, estudos recentes demonstraram que *debris* do trofoblasto circulam no sangue materno e contém pool de antígenos HLA-DR fetais intracitoplasmáticos (RANELLA et al., 2005; ADAMS et al., 2007). Células dendríticas imaturas capturam esses debris e induzem tolerância periférica, pela geração de células T reguladoras CD4+CD25+, deleção ou anergia de células T (STEINMAN et al., 2003). No processo de deleção de células T CD8+, antígenos HLA-G solúveis (BOUTEILLER et al., 2003) e Fas-ligante expressos no trofoblasto extraviloso induzem apoptose em células CD8, resultando em indução de tolerância (MAKRIGIANNAKIS et al., 2001).

**SUBPOPULAÇÕES CELULARES NA INTERFACE MATERNO-FETAL**

O ambiente imunológico da decídua é completamente diferente do encontrado no sangue periférico. No início da gestação, a população de células T (CD8+, CD4+ e células B) na decídua é de aproximadamente 10-15%, predominando (60-80%) a população de células NK CD16-CD56+, conhecidas como NK uterinas (uNK). Outras populações celulares como células T$\gamma\delta$ e macrófagos fazem parte dos leucócitos presentes na interface materno-fetal (HUDLESTON & SCHUST, 2004). Assim, componentes das respostas imunes, inata e adaptativa, têm papel importante na adaptação imune materna à gestação.

Tanto células T como NK estão aumentadas na decídua basal, no sítio de implantação (ZENCLUSSEN et al., 2005), sugerindo que células T, que se acumulam na interface materno fetal, têm importante papel na manutenção da gestação.

Após ativação, ambas as células T e NK produzem citocinas, tanto de perfil Th1 como Th2 (SAITO et al., 2007b). Estudos empregando citometria de fluxo, para avaliar as subpopulações de células NK no sangue periférico e decídua no início da gravidez, demonstraram que o perfil das células e das citocinas muda dramaticamente durante a gestação, nos dois compartimentos. No sangue periférico de mulheres não grávidas, a principal população é de células NK1, produtoras de IFN-$\gamma$ (60%), enquanto as demais populações NK2, NK3, NKr1 estão em pequena concentração (< 2%). Na gestação, células NKr1, produtoras de IL-10 aumentam em mais de 20% em relação aos valores de mulheres não-grávidas. Por outro lado, a principal população de células deciduais

NK3, produtoras de TGF-$\beta$ está elevada, enquanto NK1 cai para 2% (HIGUMA-MIYOJO et al., 2005). Esses resultados demonstram que, na gestação, células NKr1 são as células predominantes no sangue periférico, enquanto as NK3 predominam na decídua, atuando no processo de imunorregulação (SAITO et al., 2007b).

Células NK deciduais produzem citocinas que promovem a proliferação e diferenciação e, também fatores angiogênicos como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento placentário (PlGF), TGF-$\beta$ e angiopoietina (HANNA et al., 2006; TABIASCO et al., 2006), sugerindo ser importante fonte de fatores angiogênicos no leito placentário (LASH et al., 2006). A má-adaptação do balanço de citocinas e fatores angiogênicos, produzidos por células NK, parece estar envolvida na indução de pré-eclâmpsia. Segundo LEVINE et al. (2006) fatores antiangiogênicos solúveis como tirosina-kinase 1 fms-like (sFlt1), capaz de sequestrar os fatores angiogênicos VEGF e PlGF e, a endoglina, co-receptor e inibidor de TGF-$\beta$, estão aumentados na circulação materna e portanto, envolvidos na patogênese da pré-eclâmpsia. O aumento dos níveis circulantes de endoglina solúvel e da relação sFlt1:PlGF, dois a três meses antes do aparecimento da

pré-eclâmpsia, podem ser considerados marcadores biológicos preditivos da manifestação clínica dessa patologia.

Não há dúvida de que a tolerância materna ao enxerto feto-placentário é o resultado da integração de numerosos mecanismos de diferentes origens e modo de ação, que atuam em sinergismo, permitindo o sucesso da gestação. É descrito que um sistema de imunorregulação local, envolvendo células reguladoras da resposta imune como células T CD4+CD25+, Th3, T reguladora Tr1, células NK reguladoras e a enzima indolamina deoxigenase (IDO), têm papel

importante na manutenção da gestação. Não apenas células Treg, mas também células NKreg podem inibir o ataque fetal pelas células do organismo materno (Saito *et al*., 2007b).

O controle da resposta de linfocitos T auto-reativos por células Treg é essencial para indução e manutenção da tolerância (SAITO et al., 2007b). Essas

células incluem células Treg CD4+CD25+, bem como diferentes subpopulações supressoras de células T, como Th3 e Tr1 presentes no sangue periférico (BLUESTONE et al., 2003; SAKAGUCHI et al., 2004;).

Células Treg CD4+CD25+ tem papel importante na tolerância a aloantígenos (ALUVIHARE et al., 2006) e desempenham importante papel na manutenção da gestação (SAITO et al., 2007b). No início da gestação o número dessas células aumenta no sangue periférico, chegando ao máximo no segundo trimestre e diminuindo após o parto (SOMERSET et al., 2004). Nos casos de aborto recorrente o número de linfócitos Treg CD4+CD25+ no sangue periférico e decídua retornam a níveis semelhantes aos de mulheres não grávidas, (SASAKI et al., 2004), sugerindo que o aumento dessas células é essencial para manutenção da gestação (SAITO et al., 2007b).

As células Treg CD4+CD25+ podem regular a resposta imune por diferentes mecanismos: 1) pela interação célula-célula, embora esse mecanismo ainda não esteja totalmente esclarecido. A expressão de TGF-$\beta$ na superfície das células Treg CD4+CD25+ sugere ser esta molécula efetora para a imunorregulação (NAKAMURA et al., 2001); 2) as células Treg secretam TGF-$\beta$ e IL-10, que inibem a ativação de células T efetoras; 3) A presença da molécula CTLA-4 nessas células induz a expressão da enzima indolamina 2,3-

dioxigenase (IDO) em células dendríticas e macrófagos (GROHMANN et al., 2002) durante a

gestação, que protege o desenvolvimento fetal da resposta imune materna (MUN et al., 1998) (Figura 2). Estudos in vitro mostraram que o efeito imunorregulador das células Treg CD4+CD25+ só ocorre quando há o contato célula-célula (SASAKI et al., 2004).

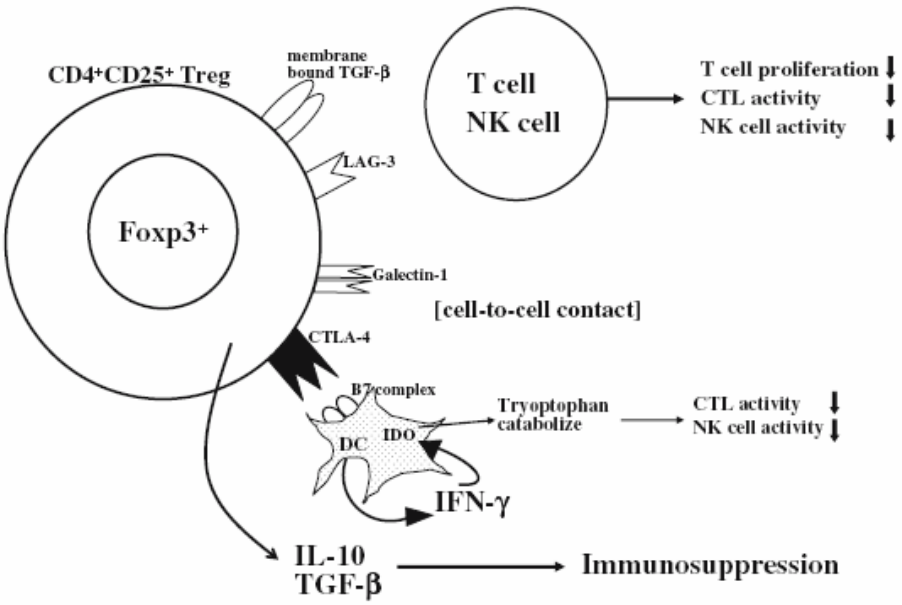



**Figura 2.** Mecanismos de imunorregulação mediados por células T reguladoras $CD4^{+}CD25^{+}$ Foxp3. Células Treg regulam a ativação de outras células imunes por contato direto célula-célula via moléculas TGF-$\beta_1$ e CTLA-4 e secreção de IL-10 e TGF-$\beta_1$. (Saito et al., 2007).

SASAKI et al., (2007) avaliaram a percentagem de células Treg CD4+CD25+ no sangue periférico de pacientes com formas graves de PE. Comparando com gestantes normais, verificaram diminuição significativa da freqüência dessas células expressando Foxp3, o principal marcador de células Treg. A pesquisa de células Treg CD4+CD25+ expressando Foxp3, em biópsias de leito placentário de pacientes com PE, mostrou resultados significativamente menores do que nas gestantes normais, sugerindo que na pré-eclâmpsia a diminuição de células Treg ocorre tanto no sangue como na decídua. Essa diminuição no número de células Treg associada à função

deprimida dessas células, pode anular a tolerância materna ao feto na pré-eclâmpsia (SAITO et al., 2007).

Atualmente, a teoria Th1/Th2 inicialmente proposta para explicar a tolerância materna ao semi-enxerto fetal (WEGMANN et al., 1993) tem mudado para o paradigma Th1/Th2/Th3/Tr1 e CD4+CD25+ e NK1, NK2, NK3 e NKr1, pelo perfil semelhante de citocinas que produzem. Ambas as populações de células T e NK com função reguladora (Th3, CD4+CD25+ Treg e NK3) parecem inibir a hiperestimulação da imunidade do tipo 1 ou 2 e promovendo tolerância adequada aos antígenos paternos presentes no semi-enxerto fetal (SAITO et al., 2007b). Um defeito no balanço regulador dessas células no início da gestação poderá causar complicações da gestação como aborto e PE.

## ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE E PERFIL DE CITOCINAS NA PRÉ-ECLÂMPSIA

Na gestação normal monócitos e neutrófilos do sangue periférico expressam marcadores de ativação, sugerindo que o sistema imune inato já está ativado (SACKS et al., 1998; REDMAN et al., 1999), enquanto o sistema imune adaptativo, incluindo células T e B, não expressa marcadores de ativação (SAITO et al., 1999a). O ambiente imune muda drasticamente na PE, sendo que a característica imunológica mais importante encontrada nesta patologia é a ativação tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo. Neutrófilos e monócitos estão excessivamente ativados (SACKS et al., 1998; REDMAN et al., 1999; GERVASI et al., 2001; SARGENT et al., 2003) e células NK, T CD4+ e CD8+ também se encontram em estado de ativação (SAITO et al., 1999; DARMOCHWAL-KOLARZ, et al., 2001).

Células imunes, particularmente os macrófagos, são a maior fonte de citocinas e de fatores de crescimento, contribuindo para a manutenção do equilíbrio entre os tipos de citocinas e as células linfocíticas presentes na placenta
(ABRAHAM et al., 2004). A grande infiltração dessas células na interface materno-fetal sugere que estejam envolvidas em funções específicas associadas à gravidez e não somente na resposta imune (ABRAHAM et al., 2004). Na placenta, essas células são capazes de exercer influência anti-

inflamatória e, ao contrário dos macrófagos classicamente ativados, que produzem citocinas pró-inflamatórias, os placentários liberam IL-10, importante citocina anti-inflamatória (BOYD et al., 1987).

HUPPERTZ et al. (2003) relataram que, na gestação de termo, grande quantidade de debris do trofoblasto são liberados na circulação materna, originados de células apoptóticas do trofoblasto. A ingestão de células apoptóticas por fagócitos resulta em resposta ativa imunossupressora e anti-inflamatória (STEINMAN et al., 2003; ABRAHAM et al., 2004). Esses macrófagos produzem citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF-$\beta$ e regulam a inflamação e imunidade tipo Th1. Entretanto, na pré-eclâmpsia, condições de hipóxia, inflamação excessiva e estresse oxidativo induzem necrose ou apo-necrose do trofoblasto (HUPPERTZ et al., 2003). Quando macrófagos ou células dendríticas fagocitam esses corpos apo-necróticos ou necróticos, produzem TNF-$\alpha$, IL-12 e IFN-$\gamma$ e aumentam a inflamação (HUPPERT et al., 2003; ABRAHAM et al., 2004). Essas condições podem induzir apoptose de células extravilosas, resultando em placentação deficiente na pré-eclâmpsia (SAITO & SAKAI, 2003; ABRAHAM et al., 2004). Além disso, células endoteliais podem também fagocitar trofoblasto necrótico, levando ao aumento de expressão de moléculas ICAM-1, bem como aumento de adesão de monócitos às células endoteliais (CHEN et al., 2005). Assim, a necrose do trofoblasto induz hiperativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos, resultando em disfunção endotelial sistêmica na pré-eclâmpsia (SAITO et al., 2007).

A gestação é uma condição particular, na qual além da presença do aloenxerto fetal no útero existe a placenta, um órgão específico da gestação. Portanto, deve-se considerar o perfil de citocinas não só produzido por células imunocompetentes, como também pela placenta ou decídua. Na pré-eclâmpsia, a ativação das células, tanto da imunidade inata como da adaptativa na pré-eclâmpsia aumenta a produção de citocinas que atuam na interface materno-fetal ou sistêmicamente (SAITO et al., 2007).

A literatura refere que, durante a gestação, o balanço Th1/Th2 apresenta desvio evidente para a resposta do tipo Th2, tanto na interface materno-fetal (MICHIMATA et al., 2002) e na resposta sistêmica (PICCINI et al., 1998; SAITO et al., 1999b), embora existam resultados conflitantes (BATES et al., 2002; CHAOUAT, 2003; CHAOUAT et al., 2003). De qualquer modo, o papel

predominante da imunidade do tipo Th2 sobre a do tipo Th1 pode ter importante papel no sucesso da gestação, pelo menos em parte, pela regulação da resposta imune alogênica ao feto e da resposta inflamatória presente na gestação normal (SAITO et al., 2007a).

Alguns trabalhos mostraram que o plasma de pacientes com PE contém grande quantidade de citocinas do tipo Th1, como IL-2, TNF-$\alpha$ e IL-12 (KUPFERMINC et al., 1994; MEEKINS et al., 1994; VINCE et al., 1995), embora estudos mais recentes não confirmem esse achado (JONSSON et al., 2006). Segundo SAITO et al. (2007a), na pré-eclâmpsia observa-se baixo nível de citocinas de padrão Th2 devido à diminuição do número de células Th2 circulantes. Estudos *in vitro* mostraram que quando células Th1 e Th2 são estimuladas por mitógenos como fitohemaglutinina, ambas respondem produzindo os vários tipos de citocinas. Como resultado, a concentração de citocinas de perfil Th1 é maior em relação às de padrão Th2, pois o numero de células Th2 diminui na circulação de pacientes com pré-eclâmpsia. Como resultado, o balanço Th1/Th2 é desviado para imunidade do tipo Th1 (WILCZYNSKI et al., 2003; JONSSON et al., 2005; AZIZIEH et al., 2005; SAITO et al., 2007a). Outros estudos revelaram que o perfil predominante de citocinas produzidas por células TCD8+, NK e NKT também era do tipo Th1 na PE (DARMOCHWAL-KOLARZ et al., 2002; BORZYCHOWAKI et al., 2005). Assim, a análise de marcadores de superfície celular e de citocinas intracitoplasmáticas, por citometria de fluxo, pode ser útil para melhor conhecimento do balanço Th1/Th2 na pré-eclâmpsia.

As citocinas IL-12 e IL-18, produzidas por células dendríticas e monócitos, têm papel importante na diferenciação de células Th1 e Th2, a partir de células Th0. Quando ambas citocinas estão presentes ocorre o desvio para Th1, enquanto o desvio para Th2 ocorre quando apenas IL-18 está presente. O estudo da relação IL-12/IL-18 mostrou correlação negativa com o balanço Th1/Th2, porque a secreção de IL-12 está elevada na pré-eclâmpsia (SAKAI et al., 2004). Interferon-gama (IFN-$\gamma$) e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) estimulam a produção de IL-12 por monócitos em resposta ao LPS, enquanto IL-10, TGF-$\beta$ e Prostaglandina E2 (PGE2) inibem a produção dessa citocina (WITTMANN et al., 1999). Na

gestação normal a produção de IL-12 pode ser regulada por IL-10, TGF-β e PGE2 que são produzidas por células do trofoblasto, células amnióticas e deciduais. Assim, produção elevada de IFN-γ e GM-CSF por células T, NK ou monócitos, que fagocitam debris de células trofoblásticas, podem aumentar a síntese de IL-12, resultando em resposta do tipo Th1.

As citocinas IL-10 e TGF-β regulam a imunoestimulação e a inflamação, verificando-se aumento da produção de IL-10 por células NK CD56+ e T $CD56^-$ durante a gestação (HIGUMA-MYOJO et al., 2005). Na PE, células mononucleares deciduais e do sangue periférico produzem baixa concentração de IL-10 em comparação com gestantes normais (DARMOCHWAL-KOLARZ et al., 1999; WILCZYNSKI et al., 2002). Além disso, foi observada menor expressão de IL-10 no trofoblasto viloso de gestantes com pré-eclâmpsia (HENNESSY et al., 2002) e aumento da relação IL-2/IL-10 e de TNF/IL-10 em tecido placentário dessas pacientes (DONG et al., 2005). Segundo SAITO et al. (2007a) não apenas as células imunocompetentes, mas também as células trofoblásticas regulam a imunoestimulação pela produção de TGF-β e IL-10. A imunoestimulação excessiva, por trofoblasto necrótico, a condição de hipóxia e a angiogênese insuficiente podem desviar a imunorregulação local, resultando em condição inflamatória sistêmica e disfunção endotelial sistêmica.

LUPPI & DELOIA (2006) verificaram que monócitos do sangue periférico de gestantes com pré-eclâmpsia, não estimulados in vitro, apresentavam maior expressão intracitoplasmática de IL-1β, IL-6 e IL-8. Porém quando estas células eram estimuladas com LPS a percentagem de monócitos IL-1β+ era significativamente menor. Esses resultados sugerem que na PE monócitos se encontram endogenamente ativados e secretam citocinas inflamatórias. Resultados semelhantes foram descritos por PERAÇOLI et al. (2007), avaliando a produção de TNF-α em gestantes normais e com pré-eclâmpsia, verificaram que tanto os níveis séricos como a produção endógena da citocina por monócitos de sangue periférico foram significativamente elevados em gestantes com pré-eclâmpsia, sugerindo o estado de ativação dessas células.

Segundo REDMAN & SARGENT (2003), no organismo de gestantes com pré-eclâmpsia ocorre resposta inflamatória generalizada, associada à produção de níveis elevados de TNF-α, IL-6 e IL-8. O significado dessas alterações

imunológicas na patogênese da pré-eclâmpsia é ainda desconhecido. Assim, o estado de ativação de monócitos nesta patologia, demonstrado pela elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como pela produção de radicais livres (BERGE et al., 1988; SACKS et al., 1998), podem causar alterações endoteliais, característica da doença.

Em conjunto, os dados da literatura sugerem que a PE é o resultado de uma resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias como monócitos e granulócitos, bem como ativação de células endoteliais, que fazem parte do sistema inflamatório (HAEGER et al., 1992; REDMAN et al., 1999; SACKS et al., 1998). Monócitos circulantes no sangue periférico se encontram ativados e representam uma das fontes de citocinas inflamatórias (LUPPI & DELOIA, 2006; PERAÇOLI et al., 2007), podendo estar envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da pré-eclâmpsia.

A ativação excessiva de monócitos e granulócitos intravasculares e, de macrófagos, descrita na pré-eclâmpsia, sugere que a ativação do sistema imune inato pode causar problemas na progressão da gestação. Nesse sentido, o emprego de agentes moduladores da reação inflamatória poderia ser uma alternativa no tratamento da pré-eclampsia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*


Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T. 6ªed. Elsevier editora Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. cap 6, 2008; p.113-36.

Abraham VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. Am J Reprod Immunol 2004; 51:275–82.

Adams KM, Yan Z, Stevens AM, Nelson JL. The changing maternal ‘‘Self’’ hypothesis: a mechanism for maternal tolerance of the fetus. Placenta 2007; 28: 378-82.

Aluvihare VR, Betz AG. The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance. Immunol Rev. 2006; 212:330-43.

Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol 2005; 54:30–7.

Bates M.D, Quenby S, Takakuwa K, Johnson, PM, Vince GS. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? Hum Reprod 2002; 17:2439–44.

Berge LN, Ostensen M, Ravhaug A. Phagocytic cell activity in pre-eclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand 1988; 67:499-504.

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nat Rev Immunol 2003; 3:253-7.


* Referências bibliográficas elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submetted to biomedical Journal Ann Intern Méd 1997; 126:36-47.

Boyd PA, Lindenbaum RH, Redman C. Pre-eclampsia and trisomy 13: a possible association. Lancet 1987; 22:425-7.

Borzychowski AM, Croy BA, Chan WL, Redman CW, Sargent IL. Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells. Eur J Immunol 2005; 35:3054–63.

Bouteiller PL, Pizzato N, Barakonyi A, Solier C. HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. J Reprod Immunol 2003. 59:219–34.

Brosens I, Robertson WB, Dixon HG. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. J Pathol Bacteriol 1967; 93:569-79

Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. Hum Reprod Update 1998; 4:25-42.

Carossella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. Immunol Today 1999; 20:60-2.

Chaouat G. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. Clin Exp Immunol 2003; 131:393–5.

Chaouat G, Ledee-bataille N, Zourbas S, Dubanchet S, Sandra O, Martal J, Ostojojic S, Frydman R. Implantation: can immunological parameters of implantation failure be of interest for pre-eclampsia? J Reprod Immunol 2003; 59: 205–17.

Chen Q, Stone PR, McCowan LM, Chamley L.W. Phagocytosis of necrotic but not apoptotic trophoblasts induces endothelial cell activation. Hypertension 2005; 47:116–21.

Chesley LC, Cooper DW. Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. Br J Obstet Gynaecol 1986; 93:898-908.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood 1998; 91:3527-61.

Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia.
Am J Reprod Immunol 1997; 37:240-9.

Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Leszczynska-Goarzelak B, Oleszczuk J. The expressions of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. Am J Reprod Immunol 2002; 48:381-6.

Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzelak B, Rolinski J, Oleszczuk J. Eur J. T helper 1- and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia. Obstet Gynecol Reprod Biol 1999; 86:165-70.

Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzelak B, Rolinski J, Oleszczuk J. Pre-eclampsia affects the immunophenotype of neonates. Immunol Lett 2001; 1; 77:67-71.

Dekker, G. The partner’s role in the etiology of preeclampsia. J. Reprod. Immunol 2002; 57:203–15.

Dekker G.A, Sibai B.M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: currents concepts. Am J Obstet Gynecol 1998; 179, 1359-75.

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

Dong M, He J, Wang Z, Xie X, Wang H. Placental imbalance of Th1- and Th2-type cytokines in preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand 2005; 84:788– 93.

Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and *in vivo* level. FEBS Lett 1991; 285:199.

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. Science 1997; 12:1669-72.

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; 185:792–7.

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat Immunol 2002; 3:1097-1101.

Haeger M, Unander M, Norder-Hansson B, Tylman M, Bengtssom A. Complement, neutrophil, and macrophage activation in women with severe preeclampsia and the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Obstet Gynecol 1992; 79:19-26.

Hahn S, Gupta AK, Troeger C, Rusterholz C, Holzgreve W. Disturbances in placental immunology: ready for therapeutic interventions? Springer Semin. Immunopathol 2006; 27:477–93.

Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal–maternal interface. Nat. Med 2006; 12:1065–74.

Hennessy A, Orange S, Willis N, Painter DM, Child A, Horvath JS. Transforming growth factor-beta 1 does not relate to hypertension in pre-eclampsia. Clin Exp Pharmacol Physiol 2002; 29:968-71.

Henrich WL. The endothelium--a key regulator of vascular tone. Am J Med Sci 1991; 302:319-28.

Higgins JR, Brennecke SP. Pre-eclampsia--still a disease of theories? Curr Opin Obstet Gynecol 1998; 10:129-33.

Higuma-Myojo S, Sasaki Y, Miyazaki S, Sakai M, Shiozaki A, Miwa N, Saito S. Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol 2005; 54:21–29.

Huddleston H, Schust DJ. Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation. Am J Reprod Immunol 2004; 51:283-9.

Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C.HLA-G and immune tolerance in pregnancy. FASEB J 2005; 19:681-93.

Huppertz B, Kingdom J, Caniggia I, Desoye G, Black S, Korr H, Kaufmann P. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. Placenta 2003; 24:181–90.

Imboden JB, Seaman WE. Linfócitos T e células natural killer. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Imunologia Médica. 10ª. ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2004, p.113-26.

Iwatani Y, Watanabe M. The maternal immune system in health and disease. Curr Opin Obstet Gynecol 1998; 10:453-8.

Jonsson Y, Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Nieminen K, Ekerfelt C. Indications of an altered immune balance in preeclampsia: a decrease in in vitro

secretion of IL-5 and IL-10 from blood mononuclear cells and in blood basophil counts compared with normal pregnancy. J Reprod Immunol 2005; 66:69-84.

Jonsson Y, Rubèr M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. J Reprod Immunol 2006; 70:83-91.

Kelemen K, Paldi A, Tinneberg H, Torok A, Szekeres-Bartho J. Early recognition of pregnancy by the maternal immune system. Am J Reprod Immunol 1998; 39: 351-5.

Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. Br J Obstet Gynaecol 1986; 93:1049-59.

Khong TY, Sawyer IH, Heryet AR. An immunohistologic study of endothelialization of uteroplacental vessels in human pregnancy--evidence that endothelium is focally disrupted by trophoblast in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1992; 167: 751-6.

King A, Loke YW. On the natire and function of human uterine granular lymphocytes. Immunol Today 1991; 12:432-5.

King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW.Human uterine lymphocytes. Hum Reprod Update 1998;4:480-5.

King A, Hiby SE, Gardner L, Joseph S, Bowen JM, Verma S, Burrows TD, Loke YW. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors--a review. Placenta 2000; 21;81-5.

Koelman CA, Coumans AB, Nijman HW, Doxiadis II, Dekker GA, Claas FH. Correlation between oral sex and a low incidence of preeclampsia: a role for soluble HLA in seminal fluid? J Reprod Immunol 2000; 46:155-66.

Klonoff-Cohen, H.S., Savitz, D.A., Cefalo, R.C., McCann, M.F. An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. JAMA 1989; 262:3143–7.

Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. Am J Obstet. Gynecol 1994; 170:1752–7.

Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. J Leukoc Biol 2006; 80:72-80.

Lefevre G, Berkane N, Uzan S, Etienne J. Pre-eclampsia and oxygenated free radicals. Ann Biol Clin 1997; 55:443-50.

Lenfant F, Fort M, Rodriguez AM, Campan A, Aguerre-Girr M, Sommer E, Abbal M, Ohayon E, Le Bouteiller P. Absence of imprinting of HLA class Ia genes leads to co-expression of biparental alleles on term human trophoblast cells upon IFN-gamma induction. Immunogenetics 1998; 47:297-304.

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group, Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. N Engl J Med 2006; 7:992-1005.

Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize proinflammatory cytokines. Clin Immunol 2006; 118:268–75.

Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. Nat Immunol 2001; 2:1018–24.

Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Erkerfelt C, Jonsson Y, Sharma S. Immuology of preeclampsia. Chem Immunol Allergy 2005; 89:49-61.

Meekins JW, McLaughlin PJ, West DC, McFadyen IR, Johnson PM. Endothelial cell activation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and the development of pre-eclampsia. Clin Exp Immunol 1994; 98:110–14.

Michimata T, Tsuda H, Sakai M, Fujimura M, Nagata K, Nakamura M, Saito S. Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D(2)-mediated manner. Mol Hum Reprod 2002; 8:181–7.

Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. Nat Rev Immunol 2002; 2:656-63.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986; 136:2348-57.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science 1998; 281:1191–3.

Münz C, Holmes N, Ling A, Loke YW, Colonna M, Schild H, et al. Humam histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. J Exp Med 1997; 185:385-91.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. J Exp Med 2001; 3:629-44.

Peraçoli JC, Martins RAR, Cruz MSP, Peraçoli MTS. Aspectos imunológicos da interação materno-fetal. Femina 2003; 31:247-51.

Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT., 2007.Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 57:177-85.

Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. Nat Med 1998; 4:1020-4.

Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S. Environmental factors favoring the allergen-specific Th2 response in allergic subjects. Ann N Y Acad Sci 2000; 917:844-52.

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

Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruysse L, van Assche A. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 1991; 98:648-55.

Pijnenborg R, D'Hooghe T, Vercruysse L, Bambra C. Evaluation of trophoblast invasion in placental bed biopsies of the baboon, with immunohistochemical localisation of cytokeratin, fibronectin, and laminin. J Med Primatol 1996; 25:272-81.

Ranella A, Vassiliadis S, Mastora C, Valentina M, Dionyssopoulou E., Athanassakis I. Constitutive intracellular expression of human leukocyte antigen (HLA)-DO and HLA-DR but not HLA-DM in trophoblast cells. Hum Immunol 2005; 66:43–55.

Redman CWG, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1999; 180:499–506.

Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. Placenta 2003; 24:21-7.

Rijhsinghani A, Yankowitz J, Strauss RA, Kuller JA, Patil S, Williamson RA. Risk of preeclampsia in second-trimester triploid pregnancies. Obstet Gynecol 1997; 90:884-8.

Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. Am J Obstet Gynecol 1989; 161:1200–4.

Roberts JM, Redman CW. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. Lancet 1993; 5:1447-51.

Roberts JM, Lain KY. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. Placenta 2002; 23:359-72.

Robertson SA, Bromfield JJ, Tremellen KP. Seminal 'priming' for protection from preeclampsia – a unifying hypothesis. J Reprod Immunol 2003; 59:253–65.

Robillard PY, Hulsey TC, Alexander GR, Keenan A, de Caunes F, Papiernik E. Paternity patterns and risk of preeclampsia in the last pregnancy in multiparae. J Reprod Immunol 1993; 24:1–12.

Robillard PY, Hulsey TC, Perianin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E. Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. Lancet 1994; 344:973–5.

Robillard PY, Hulsey TC, Dekker GA, Chaouat G. Preeclampsia and human reproduction. An essay of a long term reflection. J Reprod Immunol 2003; 59:93-100.

Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunol Today 1991; 12:256-7.

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

Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. Increased T-helper 1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. Am J Reprod Immunol 1999a; 41:297–306.

Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. Clin Exp Immunol 1999b; 117:550–5.

Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. J Reprod Immunol 2003; 59:161–73.

Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Nakashima A, Shiozaki A. Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. J Reprod Immunol 2007; 76:30-9.

Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. Mol Aspects Med 2007a; 28:192-209.

Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. Semin Immunopathol 2007b; 29:115-122.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol 2004; 22:531–62.

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

Salha O, Sharma V, Dada T, Nugent D, Rutherford AJ, Tomlinson AJ, Philips S, Allgar V, Walker JJ. The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy. Hum Reprod 1999; 14:2268–73.

Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S, Redman CW. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. J Reprod Immunol 2003; 59:153–60.

Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. Mol Hum Reprod 2004; 10:347–53.

Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J. Saito, S. Proportion of peripheral blood- and decidual-CD4+CD25bright regulatory T cells in pre-eclampsia. Clin Exp Immunol 2007; 149:139-45.

Sibai BM. Thrombophilia and severe preeclampsia: time to screen and treat in future pregnancies? Hypertension 2005; 46:1252-3.

Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT. The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. N Engl J Med 2002; 346:33–8.

Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. Immunology 2004; 112:38-43.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annu. Rev. Immunol 2003; 21:685–711.

Tabiasco J, Rabot M, Aguerre-Girr M, El Costa H, Berrebi A, Parant O, Laskarin G, Juretic K, Bensussan A, Rukavina D, Le Bouteiller P. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties -- a review. Placenta 2006; 27:34-9.

Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. Curr Opin Immunol 2000; 12: 731-7.

Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. Epidemiology 1996; 7:240–4.

Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture.Hypertension 1989; 13:658-67.

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. Nat Med 2006; 12:642–9.

Vince GS, Johnson PM. Materno-fetal immunobiology in normal pregnancy and its possible failure in recurrent spontaneous abortion? Hum Reprod 1995; 10:107-13.

Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 1995; 102:20–5.

Vinatier D, Prolongeau JF, Dufour P, Tordjeman N, Theeten G, Depret S. Physiopathology of pre-eclampsia: the role of immunology. J Gynecol Obstet Biol Reprod 1995; 24:387-399.

von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, Farine D, Lye SJ, Ritchie JW, Rotstein OD. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol 1999; 181:408-14.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today 1993; 14:353-6.

Weetman AP. The immunology of pregnancy. Thyroid 1999; 9:643-6.

Wilczynski JR, Tchorzewski H, Glowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, Szpakowski M, Zeman K, Wilczynski J. Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and pre-eclampsia. Mediators Inflamm 2002; 11:105–11.

Wilczynski JR, Tchorzewski H, Banasik M, Glowacka E, Wieczorek A, Lewkowicz P, Malinowski A, Szpakowski M, Wilczynski J. Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003; 109:8–15.

Wittmann M, Larsson VA, Schmidt P, Begemann G, Kapp A, Werfel T. Suppression of interleukin 12 production by human monocytes after preincubation with lipopolysaccharide. Blood 1999; 94:1717–26.

Zeeman GG, Dekker GA. Pathogenesis of preeclampsia: a hypothesis. Clin Obstet Gynecol 1992; 35:317-37.

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T, Kotsch K, Leber J, Volk HD. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. Am J Pathol 2005; 166:811–22.

Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: a strategy for successful endovascular invasion? J Clin Invest 1997; 99:2139-51.

# Capítulo II

*Efeito da silibinina sobre o metabolismo oxidativo e produção de citocinas por monócitos em gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia.*

# Resumo

**Resumo**

**Introdução e objetivos:** O aumento da atividade dos radicais livres e da produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos pode estar envolvido na patogênese da pré-eclâmpsia. A silibinina é o componente mais ativo da silimarina (*Silybum marianum)*, um flavonóide polifenólico que possui efeitos anti-oxidante e anti-inflamatório. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da silibinina sobre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como sobre a liberação de ânion superóxido ($O_2^-$) por monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia. **Métodos:** Foram selecionadas 30 gestantes com pré-eclâmpsia (PE), 30 gestantes normais (GN) e 30 mulheres normais não-grávidas (NG). Monócitos de sangue periférico foram incubados na presença ou ausência de silibinina nas concentrações de 5 e 50$\mu$g/mL por 60min e, estimulados ou não com ester de forbol (PMA) para determinação de $O_2^-$. Estes monócitos também foram estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS) por 18h e, no sobrenadante das culturas foram determinadas, pela técnica de ELISA, as seguintes citocinas: fator de necrose tumoral-alfa (TNF-$\alpha$), Interleucinas (IL-) IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e fator de crescimento e transformação (TGF-$\beta_1$). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada em hemolisado de eritrócitos dos três grupos estudados. **Resultados:** Níveis significativamente maiores de $O_2^-$ foram liberados por monócitos de gestantes com PE quando comparados com GN e NG, confirmando o estado ativado dessas células. A atividade da SOD foi significativamente maior no grupo de gestantes com PE. Os níveis endógenos de TNF-$\alpha$ foram significativamente mais elevados nas pacientes com PE, quando comparados com os grupos GN e NG, enquanto os níveis de IL-10 foram significativamente menores nas gestantes com PE. A capacidade de produção de citocinas pelos monócitos estimulados com LPS está preservada nos três grupos estudados. O tratamento com silibinina na concentração de 50ug/mL inibiu significativamente tanto a produção endógena de TNF-$\alpha$ quanto a estimulada por LPS no grupo de gestantes com PE, mas não teve efeito sobre a produção de IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF e TGF-$\beta_1$ em todos os grupos estudados. Essa concentração de silibinina também inibiu a liberação espontânea e a estimulada de $O_2^-$ pelos

monócitos nos três grupos estudados. **Conclusões:** Os resultados sugerem que a pré-eclâmpsia é caracterizada por estresse oxidativo e que monócitos maternos circulantes podem representar a fonte de citocinas inflamatórias durante a doença. A silibinina, por suas propriedades anti-oxidante e antiinflamatória, inibiu a liberação de $O_2^-$ e a produção de TNF-$\alpha$ por monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia.

# Abstract

**Abstract**

**Introduction and Objectives:** Increased free radical activity and high pro-inflammatory cytokine production by monocytes may be implicated in the pathogenesis of preeclampsia. Silibinin is a major active component of silymarin (*Silybum marianum)*, a polyphenolic plant flavonoid that has antioxidant and anti-inflammatory effects. This study investigated the in vitro effect of silibinin on monocyte production of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as on superoxide anion (O2-) release in pregnant women with preeclampsia. **Methods:** Thirty preeclamptic (PE), 30 healthy pregnant (HP) and 30 healthy non-pregnant (NP) women were included. Peripheral blood monocytes were incubated with or without silibinin at 5 and 50ug/mL for 60 min, and stimulated with or without phorbol myristate acetate (PMA) for the assessment of O2-. These cells were also cultured with or without lipopolysaccharide (LPS) for 18h and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin (IL)-6, IL-10, IL-12p40, IL-15, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and transforming growth factor-beta$_1$ (TGF-$\beta_1$) in monocyte culture supernatants were determined by ELISA. The activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) was evaluated in erythrocyte lisates of the three groups studied. **Results:** Monocytes of preeclamptic patients release significantly higher levels of $O_2^-$ in comparison to HP and NP women confirming the activation state of these cells. SOD activity in erythrocytes was significantly higher in preeclamptic patients. The endogenous levels of TNF-$\alpha$ were significantly higher in PE patients than in HP and NP groups, while IL-10 production was significantly lower in PE women. The levels of IL-6, IL-12 and GM-CSF spontaneously produced by monocytes were higher in HP and PE groups than in NP women. The capacity of cytokine production by LPS-stimulated monocytes was preserved in all the three groups studied. Silibinin treatment at 50ug/mL significantly inhibited both endogenous and LPS-stimulated TNF-$\alpha$ production in PE group, but had no effect on the production of IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF and TGF-$\beta_1$ in all groups studied. Also, this silibinin concentration significantly inhibited both spontaneous and stimulated O2- release in the three groups studied. **Conclusions:** The results suggest that preeclampsia is characterized by oxidative stress and maternal circulating monocytes represent a source of

inflammatory cytokines during the disease. Silibinin, due to its antioxidant and anti-inflammatory properties inhibited $O_2^-$ release and TNF-$\alpha$ production by monocytes from pregnant women with preeclampsia.

## 1. Introdução

A pré-eclâmpsia é uma síndrome específica da gravidez que incide entre 5% e 7% das gestantes (WALKER, 2000; ROBERTS & COOPER, 2001). Ocorre principalmente em primigestas, sendo considerada a principal causa de mortalidade materna e perinatal, principalmente nos países em desenvolvimento (SIBAI et al., 2005).

A pré-eclâmpsia 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, proteinúria e outros distúrbios sistêmicos (ROBERTS & REDMAN, 1993; REIN et al., 2003; PATERNOSTER et al., 2004).

Embora seja uma doença ainda sem etiologia, está demonstrado que sua fisiopatologia é influenciada diretamente pela placenta (ROBILLARD, 2002; REDMAN & SARGENT, 2005). Fundamentada nesse conceito, a literatura sugere a interação de vários mecanismos responsáveis pela característica multisistêmica da doença: placentação inadequada (PIJNENBORG et al., 1983), disfunção endotelial (KHAN et al., 2005), angiogênese insuficiente (LEVINE et al., 2006), má adaptação imunológica (DEKKER & SIBAI, 1999), estresse oxidativo (GUPTA et al., 2005; REDMAN & SARGENT, 2000; 2005), resposta inflamatória excessiva (REDMAN et al., 1999; REDMAN & SARGENT, 2003; KHARFI et al., 2003), trombose e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (ELSHEIKH et al., 2001).

Evidências sugerem que a exacerbação da resposta inflamatória sistêmica materna da gestação, com ativação acentuada do sistema imune inato, tem papel fundamental na fisiopatologia da pré-eclâmpsia (REDMAN et al., 1999; 1999a; SACKS et al., 1999). Assim, essa patologia é caracterizada por resposta pró-inflamatória materna excessiva, mais intensa que a da gestação normal, que pode ser demonstrada por elevada concentração plasmática ou sérica de IL-2 (SUNDER-PLASSMAN et al., 1989), de TNF-$\alpha$ (CONRAD et al., 1998; BENYO et al., 2001; TERAN et al., 2001; JOHNSON et al., 2002; PERAÇOLI et al., 2007) e de IFN-$\gamma$ (ARRIAGA-PIZANO et al., 2005); baixa concentração plasmática de IL-4 (ARRIAGA-PIZANO et al., 2005), de IL-10 (HENNESSY et al., 1999) e de IL-18 (ADAMS et al., 2003), e por

estimulação de mRNA e expressão protéica de IL-1β (RINEHART et al., 1999) e de TNF-α (WANG & WALSH, 1996; RINEHART et al., 1999) na placenta. Portanto, a PE é considerada uma doença identificada por imunidade de perfil Th1 (KUSANOVIC et al., 2007).

Também está envolvido na fisiopatologia da pré-eclâmpsia o estresse oxidativo (KHARB et al., 2000; TAKAGI et al., 2004), que atuando de maneira sistêmica, causa lesão do endotélio, fenômeno diretamente relacionado com a doença (REIN et al., 2003). Assim, é observado que a concentração plasmática de radicais livres aumenta antes do aparecimento das manifestações clínicas da doença e apresenta correlação significativa com os valores de pressão arterial (WICKENS et al., 1981; ERSKINE et al., 1985). KHARFI et al. (2005) observaram 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 ainda correlação entre esses dois parâmetros.

Na pré-eclâmpsia, em vigência de hipoxia, a placenta manifesta intenso estresse oxidativo (BURTON & JAUNIAUX, 2004; MYATT & CUI, 2004), resultante de lesão causada por hipoxia e reperfusão (BURTON & HUNG, 2003) e/ou deficiência das defesas antioxidantes (PERKINS, 2006). Por outro lado, o aumento do estresse oxidativo é um achado sistêmico da pré-eclâmpsia (ROBERTS & HUBEL, 1999), representado pela liberação de uma variedade de mediadores da disfunção da célula endotelial como os peróxidos lipídicos (WALSH, 1998), citocinas pró-inflamatórias (HUNG et al., 2004; MATTHIESEN et al., 2005) e micropartículas liberadas pelo sinciciotrofoblasto (REDMAN & SARGENT, 2000).

É descrito na pré-eclâmpsia um desbalanço entre atividade oxidante e anti-oxidante (KUMAR & DAS, 2002), favorecendo a superprodução de espécies reativas do oxigênio (BILODEAU & HUBEL, 2003), característica do estresse oxidativo, que poderia afetar a atividade funcional dos monócitos.

ILHAN et al. (2002) demonstraram que, o nível de superóxido dismutase (SOD), enzima de efeito anti-oxidante, está diminuído em pacientes com pré-eclâmpsia. Estudos com células trofoblásticas mostram que placentas de gestantes com pré-eclâmpsia apresentam concentrações elevadas de ânion superóxido, enquanto a atividade da SOD encontra-se diminuída, reforçando a

hipótese de que, nessa patologia o estresse oxidativo está aumentado no tecido placentário (SIKKEMA et al., 2001; WANG & WALSH, 2001).

Portanto, os dados da literatura sugerem que a pré-eclâmpsia é uma patologia que se acompanha de resposta inflamatória materna, representada por ativação de células inflamatórias como monócitos e granulócitos, bem como ativação de células endoteliais, integrantes do sistema inflamatório (HAEGER et al., 1992; SACKS et al., 1998; REDMAN et al., 1999a). Assim, os monócitos estariam envolvidos no mecanismo fisiopatológico da pré-eclâmpsia e participariam da intensa resposta inflamatória intravascular materna sugerida por FAAS & SCHUILING (2001).

Na pré-eclâmpsia, 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. Nesse sentido, o emprego de agentes moduladores da reação inflamatória seria uma alternativa para o tratamento dessa doença.

A silimarina é um flavonóide polifenólico, extraído de frutos e sementes de *Silybum marianum* e constituído por uma mistura de três isômeros estruturais: silibinina, silidianina e silicristina. Possui efeitos anti-inflamatórios, citoprotetores e anti-carcinogênicos (YAO-CHENG, 1991; VALENZUELA & GARRIDO, 1994), sendo que os mecanismos relacionados a esses efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, parecem envolver a supressão do fator de transcrição nuclear NF-kappaB, o qual regula a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, citoproteção e carcinogênese (MANNA et al., 1999; KANG et al., 2002; AGARWAL et al., 2006).

Segundo a literatura, a silimarina apresenta forte atividade anti-oxidante (DEHMLOW et al., 1996; KVASNICKA et al., 2003; MUZES et al., 1991). Em pacientes com doença hepática esse flavonóide aumenta a atividade da enzima superóxido dismutase em linfócitos e eritrócitos, assim como a concentração celular e o nível sérico de glutation (VALENZUELA et al., 1989; MUZES et al., 1991; WELLINGTON & JARVIS, 2001). Em animais e humanos protege as membranas das células hepáticas contra agentes tóxicos, melhorando sua função (MANNA et al., 1999) e exerce ação estabilizadora das mesmas, prevenindo ou inibindo a via da 5-lipoxigenase (YAO-CHENG, 1991; DEHMLOW et al., 1996).

A inibição da peroxidação lipídica, induzida pela silimarina, protege contra a toxicidade hepática causada por agentes como radicais livres, tetracloreto de carbono, tolueno e xileno (MOURELLE et al., 1989; BOSISIO et al., 1992; CARINI et al., 1992; WELLINGTON & JARVIS, 2001). Essa peroxidação, que se exacerba pela ação de algumas toxinas hepáticas, determina o aparecimento dos sintomas clínicos e está relacionada à produção de prostaglandinas. Já se demonstrou que os três principais componentes da silimarina (silibinina, silicristina e silidianina) suprimem a formação de prostaglandinas e promovem a decomposição dos lipídeos de membrana, sendo provavelmente esta a ação hepatoprotetora desse flavonoide (YAO-CHENG, 1991; KANG et al., 2004).

A silimarina/silibinina também exerce importante ação anti-inflamatória in vivo, sendo utilizada no tratamento clínico de doenças hepáticas inflamatórias e alcoólicas (JOHNSON et al., 2003; FALASCA et al., 2008). Estudos farmacológicos indicam que, no tratamento de cirrose hepática alcoólica, a silimarina não é tóxica, mesmo em altas concentrações (FEHÉR et al., 1987; FERENCI et al., 1989; JOHNSON et al., 2003).

Segundo DEHMLOW et al. (1996), além de propriedades hepatoprotetoras, a silimarina exerce ação citoprotetora em outros órgãos e tecidos. Em modelo experimental de inflamação aguda, a administração oral de silimarina reduziu o abscesso do coxim plantar de ratos, induzido por carragenina. Também inibiu o acúmulo de leucócitos no infiltrado inflamatório peritoneal após inoculação com carragenina, reduzindo principalmente o número de neutrófilos (DE LA PUERTA et al., 1996). Outros modelos experimentais de inflamação em ratos demonstraram que a silimarina apresenta atividade anti-inflamatória e anti-artrítica, induzidas respectivamente por látex de papaya e adjuvante completo de Freund, indicando que essas atividades são decorrentes da inibição da 5-lipoxigenase (GUPTA et al., 2000).

VARGA et al. (2001), por meio de estudo in vitro, empregaram mistura de diferentes componentes da silimarina, incluindo silibinina, com o objetivo de avaliar o efeito inibidor desse flavonoide sobre o metabolismo oxidativo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) humanos, obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis. Os autores demonstraram que os diferentes componentes da silimarina inibem a liberação de ânion superóxido ($O_2^-$) e a

produção de peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) por PMN estimulados com PMA, sugerindo que silimarina/silibinina têm propriedades anti-oxidantes sobre o metabolismo oxidativo dessas células.

KANG et al. (2004), estudando em camundongos o efeito protetor da silimarina em modelo experimental de sepse induzida por LPS, demonstraram que a administração in vivo do flavonoide aumentou a sobrevida dos animais. O cultivo in vitro de macrófagos peritoneais de camundongos, com diferentes doses de silimarina e LPS, revelou efeito inibidor dose-dependente da silimarina sobre a produção de IL-1$\beta$ e $PGE_2$ e sobre a expressão de mRNA para IL-1$\beta$ e COX-2. Segundo os autores, o efeito anti-inflamatório e protetor na sepse, determinado pela silimarina é mediado, pelo menos em parte, por sua ação inibidora sobre a produção de citocinas e mediadores inflamatórios.

A literatura sugere importante papel anti-inflamatório da silimarina/silibinina sobre modelos murinos in vivo. Entretanto, existem poucos estudos sobre o efeito desse flavonóide nas células humanas (FEHÉR et al., 1987; VARGA et al., 2001; WELLINGTON & JARVIS, 2001) e nenhum relato do efeito da silimarina sobre a produção de citocinas inflamatórias por monócitos humanos.

Citocinas inflamatórias como TNF-$\alpha$, IL-1 e IL-6 estão envolvidas na patogênese de diferentes doenças humanas como câncer (IKEMOTO et al., 2000; LELLI et al., 2003) e infecções (PERAÇOLI et al., 2003; ROOK et al., 1987), assim como em patologias da gestação como a pré-eclâmpsia (FAAS & SCHUILING, 2001; VINCE et al., 1995).

COMELLI et al. (2007) relataram, por meio de estudos in vivo e in vitro, que silimarina e silibinina protegem os tecidos do estresse oxidativo e da resposta inflamatória crônica, principalmente aqueles induzidos por reativos intermediários do oxigênio e citocinas. Tanto o estresse oxidativo quanto a inflamação estão envolvidos em lesão celular de diferentes tecidos do organismo.

Considerando que a literatura demonstra o papel anti-inflamatório da silimarina, inibindo a produção de mediadores e citocinas por células inflamatórias, estudos in vitro do efeito desse flavonoide sobre a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias por monócitos humanos, obtidos de

pacientes com pré-eclâmpsia, poderiam indicar seu uso como alternativa terapêutica no tratamento dessa doença.

## 2. Objetivos

### 2.1. Geral

Avaliar, em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, o efeito in vitro da silibinina sobre o estado de ativação de monócitos.

### 2.2. Específicos

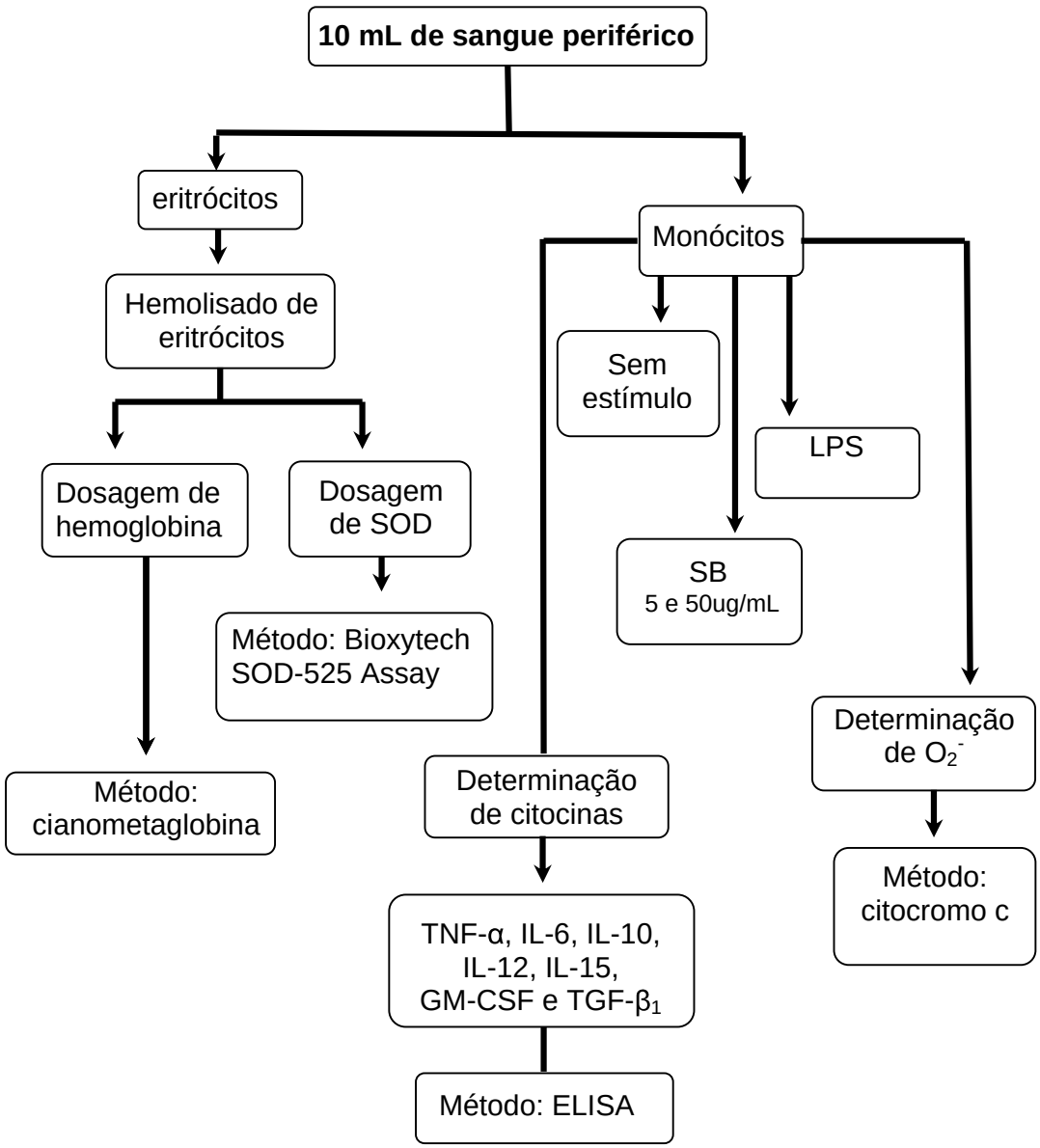
**2.2.1.** Determinar a produção de ânion superóxido e de citocinas (TNF-$\alpha$, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF e TGF-$\beta_1$) por monócitos.

**2.2.2.** Determinar a atividade da enzima superóxido dismutase em eritrócitos.

**2.2.3.** Avaliar, in vitro, o efeito de silibinina sobre a produção de ânion superóxido e de citocinas pró e anti-inflamatórias por monócitos cultivados na presença desse flavonóide.

## 3. Delineamento Experimental

### 3.1. Fluxograma de Execução de Experimentos



## 4. Casuística e Métodos

### 4.1. Pacientes e controles

Foram estudadas 30 gestantes normais e 30 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, atendidas no Serviço de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Os dois grupos foram pareados pela idade gestacional, a partir de 24 semanas, que foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou por exame ultra-sonográfico precoce.

Uma gestante foi considerada portadora de pré-eclâmpsia quando, sem antecedente prévio de hipertensão arterial, apresentou valor de pressão arterial de pelo menos 140x90mmHg e proteinúria (≥ 300mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20ª. semana de gestação, ou quando, portadora de hipertensão arterial prévia (hipertensão arterial essencial) apresentou proteinúria após a 20ª. semana de gestação (NHBPEP, 2000).

Também foram avaliadas 30 mulheres saudáveis, não-grávidas, de faixa etária semelhante à das gestantes, recrutadas entre doadoras voluntárias de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, protocolo no. 24/2007 (Anexo 1).

### 4.2. Critérios de exclusão

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

### 4.3. 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 Clinicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

### 4.4. Isolamento e cultura de monócitos

Sangue periférico foi colhido por punção venosa, sendo 10mL colocados em tubo estéril contendo 20U/mL de heparina (Liquemine, Roche). As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), segundo a técnica descrita por B∅YUM (1968). O anel rico em células mononucleares foi lavado, inicialmente com solução gelada de EDTA 0,01M em solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 (PBS), por 10 min a 200*g* e logo após com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) por mais 10 min a 200*g*. Após esses procedimentos as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma), 40µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL Life Technologies, Breda, The Netherlands) inativado (RPMI completo), sendo a identificação e a viabilidade dos monócitos estimadas por incorporação de vermelho neutro. Para isso, 50uL da suspensão de células mononucleares foram incubadas por 10 min a 37$^{o}$C com 450uL da solução de vermelho neutro a 0,02%. Os monócitos foram diferenciados dos linfócitos por apresentarem citoplasma de coloração vermelha. Assim, a concentração celular foi ajustada para 5x10$^{5}$ monócitos viáveis/mL, após contagem em câmara hemocitométrica, e distribuída em placas de cultura de 24 orifícios (Linbro, Flow Lab, USA), incubadas por 60 min a 37$^{o}$C, em tensão de 5% de $CO_2$. As células não aderentes foram eliminadas pela lavagem dos orifícios da placa com meio de cultura RPMI.

### 4.5. Obtenção de sobrenadante de cultura de monócitos

Para avaliação da produção de citocinas, os monócitos, obtidos conforme descrito no item 3.4., foram incubados a 37°C, em tensão de 5% de $CO_2$ por 18h, na ausência ou presença de silibinina (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo. USA) (5ug/mL e 50ug/mL) e/ou lipopolissacáride de *Escherichia coli*, $O_{55}B_5$ (LPS) na concentração de 10ug/mL, O sobrenadante obtido após 18h de cultivo foi aspirado, centrifugado a 600*g* e distribuído em alíquotas, que foram conservadas a -80$^{o}$C até o momento da dosagem das citocinas TNF-$\alpha$, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF e TGF-$\beta$1.

### 4.6. Determinação das citocinas TNF-$\alpha$, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF e TGF-$\beta_1$ pela técnica de ELISA

Para quantificação das citocinas nos sobrenadantes de cultura de monócitos, tratados ou não com silibinina e/ou LPS, empregou-se ensaio imunoenzimático (ELISA) e kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). As reações foram desenvolvidas segundo as instruções do fabricante.

As placas de 96 orifícios e fundo plano (MaxiSorp-Nunc Life Tech. Inc., Maryland, MA, USA) foram sensibilizadas por 18h a 5ºC com anticorpo monoclonal anti-citocina, diluído em PBS. Após esse período, os orifícios foram lavados quatro vezes com 300$\mu$L de PBS, pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). Para o bloqueio da placa colocou-se em cada orifício 300$\mu$L de PBS + BSA 1%, que foi incubado à temperatura ambiente por 60 min. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100$\mu$L dos sobrenadantes gerados e das citocinas recombinantes (R&D Systems) foram adicionados aos orifícios das placas. Após 2h de incubação à temperatura ambiente e nova lavagem da placa, o anticorpo revelador policlonal anti-citocina (R&D Systems) foi adicionado, seguido de incubação por 2h à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionados 100$\mu$L de estreptoavidina conjugada com peroxidase (R&D Systems), na concentração de 2$\mu$g/mL por 20 min a 37ºC, seguido pela lavagem da placa com PBST. Após esse período, adicionaram-se 100$\mu$L do substrato enzimático, constituído por 10$\mu$L de $H_2O_2$ a 30% (Sigma), diluídos em 12,5mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e

1mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min, a reação foi bloqueada pela adição de 50μL de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland) com comprimento de onda de 492nm. As concentrações das citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura dos monócitos, tratados ou não com silibinina e/ou LPS, foram calculadas sobre curvas padrão realizadas com as diferentes citocinas recombinantes humanas. Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonal e policlonal, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas padrão, foram aquelas recomendadas pelo fabricante (R & D Systems) e descritas no quadro abaixo.

Concentrações das citocinas recombinantes empregadas nas curvas padrão e dos anticorpos monoclonais e policlonais utilizados na determinação de citocinas em sobrenadante de cultura de monócitos, pela técnica de ELISA.

| Citocina | Citocina recombinante (curva padrão) | Anticorpo monoclonal | Anticorpo policlonal |
|---|---|---|---|
| GM-CSF | 7,8 – 1000 pg/mL | 2 ug/mL | 500 ng/mL |
| IL-6 | 4,6 – 600 pg/mL | 2 ug/mL | 200 ng/mL |
| IL-10 | 7,8 – 1000 pg/mL | 2 ug/mL | 200 ng/mL |
| IL-12p40 | 7,8 – 1000 pg/mL | 4 ug/mL | 100 ng/mL |
| IL-15 | 3,9 – 500 pg/mL | 2 ug/mL | 500 ng/mL |
| TGF-$\beta_1$ | 15,6 – 1000 pg/mL | 2 ug/mL | 300 ng/mL |
| TNF-$\alpha$ | 7,8 - 1000 pg/mL | 4 ug/mL | 75 ng/mL |

**4.7. Determinação de ânion superóxido**

A liberação de ânion superóxido ($O_2$-) pelos monócitos do sangue periférico foi determinada por cromógeno Ferricitocromo C, segundo o método de PICK & MIZEL (1981), adaptado por RUSSO et al. (1989).

Em presença de $O_2$-, o ferricitocromo C sofre oxidação, transformando-se em ferrocitocromo C**,** detectável em espectrofotômetro com filtro de 540nm.

As células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis foram obtidas de acordo com o ítem 3.4. A concentração celular foi ajustada para $2x10^6$ monócitos/mL e 100μL desta suspensão ($2x10^5$) foram distribuídos em placas de culturas de células de fundo plano (Nunc, Life Tech. Inc., Maryland, USA), contendo 96 orifícios. As placas foram incubadas por 60 min a 37ºC em tensão constante de 5% de $CO_2$. Após incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagem dos orifícios da placa com meio de cultura RPMI e os monócitos cultivados na ausência ou presença de silibinina (5ug/mL e 50ug/mL) por 2h. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi aspirado e foram adicionados 100μL de solução contendo 160μM de ferrocitocromo C (Sigma) em solução salina de Hanks, livre de vermelho de fenol, contendo 10μL de PMA (50ng) para estímulo do *burst* respiratório. Células tratadas com ferrocitocromo C e suplementadas com 300U/ml de superoxido dismutase (Sigma) foram utilizadas como *blank* da reação. As placas foram incubadas a 37ºC e 5% de $CO_2$ por 60 min e a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 540nm.

A concentração do ânion superóxido foi calculada através da seguinte relação:

$$\text{Concentração } O_2^- \text{ (nmol)} = \frac{DO \times 100}{6,3}$$

**4.8. Preparo do hemolisado de eritrócitos**

Sangue periférico foi colhido por punção venosa e colocado em tubo estéril, contendo 20U/mL de heparina (Liquemine, Roche). Após centrifugação a 200*g* por 10 min, plasma, glóbulos brancos e plaquetas foram retirados por aspiração e os eritrócitos lavados quatro vezes com solução de NaCl 0,9% por centrifugação a 200*g*. Após as lavagens, 50uL do pellet de eritrócitos foram resuspendidos em 950uL de água deionizada para lise das células. Os hemolisados foram congelados a -80°C até o momento das dosagens de hemoglobina e superóxido dismutase.

### 4.9. Dosagem de hemoglobina no hemolisado de eritrócitos

A concentração de hemoglobina no hemolisado foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (MAHONEY et al., 1993). No momento da dosagem, 20uL do hemolisado obtido foram diluídos e agitados em 2mL de solução de Drabkin. Após 10 min de repouso realizou-se a leitura da densidade óptica (DO) da solução em espectrofotômetro Ultrospec 2000, (Pharmacia Biotech, Cambridge, England, UK) a 546nm. Como *blank* utilizou-se solução de Drabkin.

### 4.10. Determinação de Superóxido Dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada nos hemolisados de eritrócitos utilizando-se o kit comercial BIOXYTECH SOD-525 Assay (Oxis Health products, Inc. Portland, OR, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O método baseia-se na auto-oxidação de 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo[c]fluorene (R1) mediada pela SOD em solução aquosa alcalina, produzindo um composto cromóforo com máxima absorção a 525nm (WANG & WALSH, 2001). Os resultados foram expressos em U/g de hemoglobina.

### 4.11. Análise Estatística

Os resultados obtidos da atividade da superóxido dismutase em eritrócitos, bem como da produção de citocinas e liberação de ânion superóxido pelos monócitos, tratados ou não com silibinina e, estimulados ou não com LPS ou PMA foram avaliados empregando-se análise de variância (ANOVA), através do programa estatístico INSTAT, Graph-Pad, San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

## 5. Resultados

### 5.1. Características das gestantes e mulheres não-grávidas

As 30 gestantes normotensas que constituíram o grupo controle eram acompanhadas no Ambulatório de Pré-natal de baixo-risco do Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. As 30 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia estavam internadas na Enfermaria de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. O grupo de mulheres não-grávidas foi constituído por 30 mulheres saudáveis, doadoras voluntárias de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Na Tabela 1 são apresentadas as características dos três grupos estudados.

**Tabela 1.** Distribuição das gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, gestantes normais e mulheres normais não-grávidas quanto à idade, idade gestacional, valor de proteinúria e de pressão arterial média.

| Parâmetros | Mulheres não-grávidas | Gestantes normais | Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia |
|---|---|---|---|
| Idade (anos) | 27 (20 - 37) | 23 (15 – 38) | 29 (16 – 40) |
| Idade gestacional (sem) | —— | 32 (24 – 39) | 33 (25 – 38) |
| Pressão arterial média (mmHg) | 90 (83 – 96) | 80 (63-97) | 117 (103 – 160) |
| Proteinúria (mg/24h) | negativa | negativa | 685 (300 – 29.600) |

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

### 5.2. Efeito da silibinina sobre a produção de ânion superóxido

Os efeitos da silibinina sobre a liberação de $O_2^-$ por monócitos humanos, obtidos de mulheres normais não-grávidas, gestantes normais e gestantes com pré-eclâmpsia, estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 1. Os níveis endógenos desse metabólito, liberados por monócitos não estimulados com PMA, foram significativamente maiores nos grupos de gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia, quando comparadas com mulheres normais não-grávidas. Os níveis produzidos pelas células das gestantes portadoras de pré-eclâmpsia foram significativamente maiores em comparação às gestantes normais. Quando as células foram ativadas com PMA houve aumento significativo na produção de $O_2^-$ pelos monócitos de mulheres não-grávidas e de gestantes normais em relação aos níveis endógenos, o que não se verificou no grupo de gestantes com pré-eclâmpsia.

**Tabela 2**. Produção de ânion superóxido por monócitos de mulheres normais não-grávidas (NG), gestantes normais (GN) e gestantes com pré-eclâmpsia (PE), estimulados ou não com éster de forbol (PMA).

| Estímulo | Mulheres não-grávidas | Gestantes normais | Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia | Significância* |
|---|---|---|---|---|
| Ausente | 1,04 ± 0,10 | 1,68 ± 0,13 | 2,17 ± 0,18 | PE > GN > NG (p<0,05) |
| PMA | 2,65 ± 0,21 | 2,53 ± 0,24 | 2,76 ± 0,28 | NS |
| Significância* | p < 0,01 | p < 0,05 | NS | |

Resultados expressos em nM/2 x $10^5$ monócitos (* *Anova)*

A análise do efeito da silibinina sobre a produção de $O_2^-$ mostra que a concentração de 50ug/mL da mesma inibiu significativamente tanto a produção espontânea quanto a estimulada desse metabólito nos três grupos estudados, enquanto a dose de 5ug/mL não apresentou esse efeito (Figura 1). Portanto, a

inibição da liberação de $O_2^-$ pela silibinina, em monócitos estimulados ou não com PMA, foi dose-dependente.

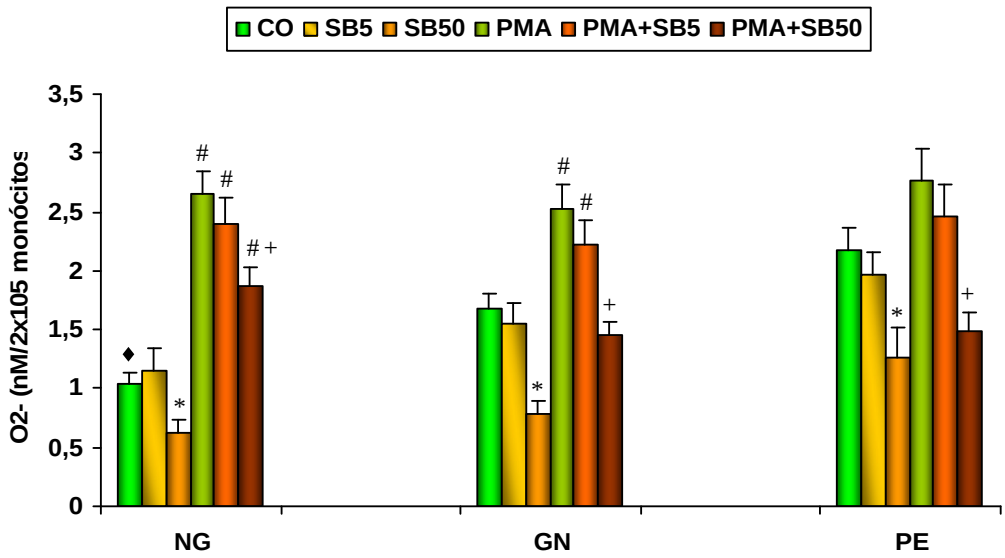



**Figura 1.** Efeito da silibinina (SB) sobre a liberação de ânion superóxido ($O_2^-$) por monócitos do sangue periférico, obtidos de mulheres normais não-grávidas (NG), de gestantes normais (GN) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), estimulados ou não (CO) com éster de forbol (PMA). Os resultados estão expressos como média ± SD.

♦*(p < 0,01) versus* controle (*GN, PE*); # *(p < 0,05) versus controle, SB5, SB50 (NG, GN);*

** (p < 0,05) versus controle, SB5 (NG, GN, PE);*

*+ (p < 0,05) versus PMA, PMA+SB5 (NG, GN, PE) (Anova)*

A comparação do efeito inibidor da silibinina sobre a produção de O2- pelas células dos três grupos estudados pode ser observada na Tabela 3. Verifica-se que, nos três grupos estudados a concentração de 50ug/mL de silibinina adicionada às culturas de monócitos, estimuladas ou não com PMA, induziu maior percentagem de inibição de $O_2^-$ que a concentração de 5ug/mL.

**Tabela 3**. Efeito da silibinina (SB) sobre a liberação de ânion superóxido ($O_2^-$) por monócitos do sangue periférico, obtidos de mulheres normais não-grávidas (NG), de gestantes normais (GN) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE), estimulados ou não com éster de forbol (PMA).

| | Estímulo | Mulheres não-grávidas | Gestantes normais | Gestantes portadoras de pré-eclâmpsia |
|---|---|---|---|---|
| SB 5µg/mL | PMA (-) | 21,7 ± 5,3 | 16,7 ± 4,6 | 31,8 ± 10,6 |
| | PMA (+) | 12,1 ± 2,9 | 18,7 ± 3,8 | 25,3 ± 7,8 |
| SB 50µg/mL | PMA (-) | 45,7 ± 4,9 | 47,6 ± 4,7 | 39,1 ± 7,9 |
| | PMA (+) | 28,2 ± 3,1 | 34,9 ± 4,8 | 37,7 ± 3,8 |

Resultados expressos em média ± SD da percentagem de inibição

### 5.3. Atividade da Superóxido Dismutase em eritrócitos de mulheres normais não-grávidas, gestantes normais e gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

Os resultados apresentados na Figura 2 mostram que a atividade da superóxido dismutase, presente nos eritrócitos, foi significativamente maior nas gestantes com pré-eclâmpsia quando comparada com as gestantes normais e mulheres não-grávidas.

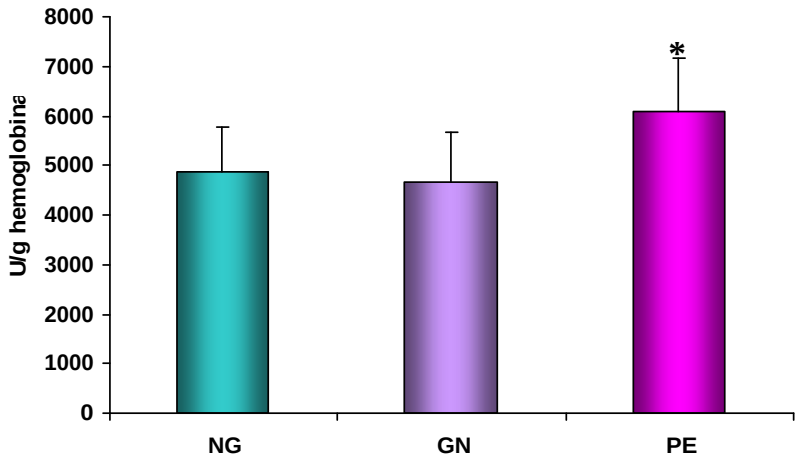



**Figura 2.** Liberação de superóxido dismutase (SOD) por eritrócitos de mulheres normais não-grávidas (NG), gestantes normais (GN) e gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE). Os resultados estão expressos como média ± SD de UI/g hemoglobina.

* (p<0,05) vs NG, GN *(Anova)*

### 5.4. Produção de TNF-alfa

Na Figura 3 estão representados os níveis endógenos de TNF-$\alpha$ produzidos por monócitos de mulheres normais não-grávidas, de gestantes normais e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia. Os resultados mostram que no grupo de gestantes com pré-eclâmpsia os níveis de TNF-$\alpha$ foram significativamente maiores do que nos grupos de mulheres não-grávidas e de gestantes normais, tanto nas culturas não tratadas com silibinina como nas tratadas com diferentes doses do flavonóide, demonstrando a ativação endógena das células nas gestantes com pré-eclâmpsia. O tratamento com silibinina na concentração de 50ug/mL inibiu significativamente a produção da citocina pelas células das gestantes com pré-eclâmpsia, mas não interferiu na produção endógena por monócitos de gestantes normais e de mulheres não-grávidas.

As duas concentrações de silibinina, empregadas no tratamento das células, apresentaram efeito inibidor significativo sobre a produção de TNF-$\alpha$ quando os monócitos foram estimulados com LPS (Figura 4). Esses resultados demonstram que a silibinina apresenta efeito inibidor sobre a produção de TNF-$\alpha$ por monócitos ativados por LPS. Não houve diferença entre os grupos com

relação aos níveis de TNF-$\alpha$ produzidos. Os resultados da Figura 4 mostram que monócitos estimulados com LPS, tanto na ausência como na presença de silibinina, produzem concentrações significativamente maiores do que as observadas nas culturas controle, tratadas ou não com esse flavonóide. Portanto, os resultados sugerem que a capacidade de produção da citocina, quando as células são estimuladas, está preservada nos três grupos estudados.

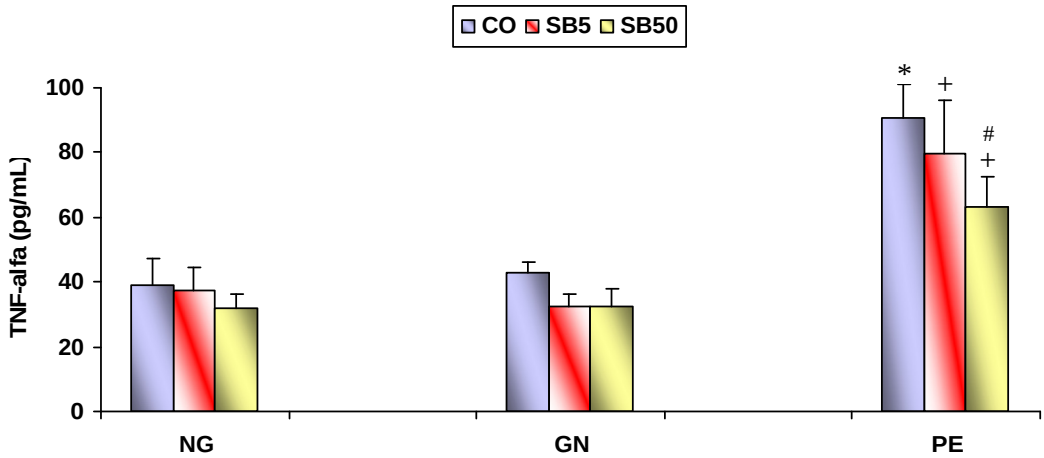



**Figura 3.** Efeito da silibinina (SB) sobre a produção espontânea de TNF-alfa por monócitos do sangue periférico, obtidos de mulheres normais não-grávidas (NG), de gestantes normais (GN) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE). Monócitos foram cultivados na ausência (CO) ou presença de silibinina nas concentrações de 5ug/mL (SB5) ou 50ug/mL (SB50). Os resultados estão expressos como média $\pm$ SD.

** (p < 0,01) versus CO (NG, GN); + (p<0,05) versus SB5, SB50 (NG, GN)*

*# (p < 0,05) versus Co (PE) (Anova)*

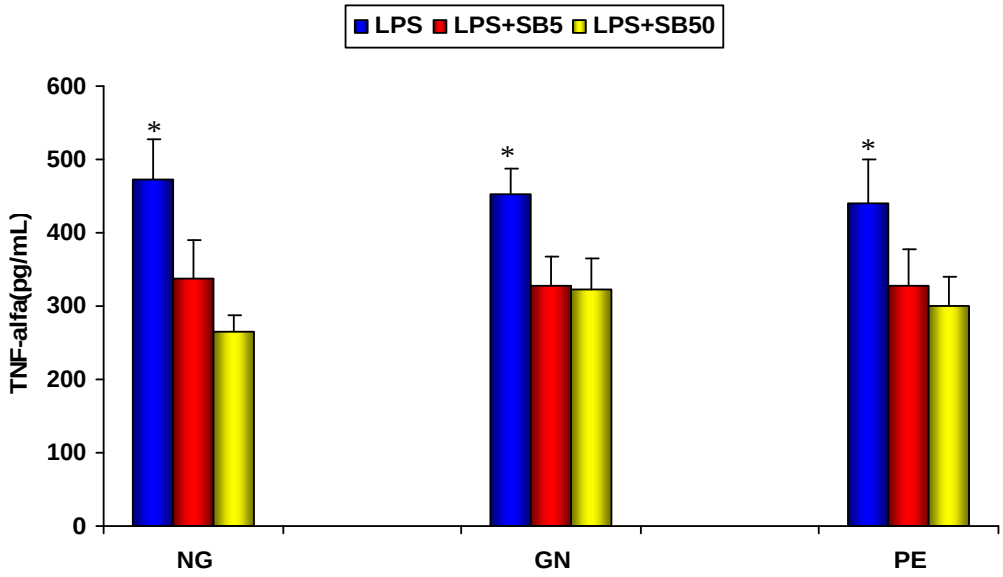



**Figura 4.** Efeito da silibinina (SB) sobre a produção de TNF-alfa por monócitos do sangue periférico, obtidos de mulheres normais não-grávidas (NG), de gestantes normais (GN) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) e estimulados com lipopolissacáride (LPS). Monócitos foram cultivados na presença de silibinina nas concentrações de 5ug/mL (SB5) ou 50ug/mL (SB50) e de 10ug/mL de LPS. Os resultados estão expressos como média ± SD.

** (p < 0,01) versus SB5, SB50 (NG, GN, PE) (Anova)*

### 5.5. Produção de IL-6

Na Figura 5 estão representados os resultados da produção de IL-6 por monócitos de mulheres normais não-grávidas, gestantes normais e gestantes com pré-eclâmpsia, detectados no sobrenadante de cultura dessas células, submetidas ou não ao tratamento com silibinina e estimuladas ou não com LPS. A produção da citocina estimulada por LPS foi significativamente maior em comparação às culturas controle não tratadas com silibinina ou tratadas com SB5 e SB50 e estimuladas com LPS nos três grupos estudados.

Observa-se que, a produção endógena de IL-6 por monócitos não estimulados com LPS, obtidos dos grupos de grávidas normais ou de portadoras de pré-eclâmpsia foi significativamente maior em comparação aos monócitos de mulheres não-grávidas. Essa diferença foi observada tanto nas culturas tratadas com SB5 e SB50, como nas culturas controle, não tratadas. Esses resultados mostram que os monócitos dos grupos de gestantes se encontram ativados, produzindo níveis maiores de IL-6 em relação ao grupo de mulheres não-grávidas. Pode-se verificar também que o tratamento de monócitos com silibinina não interferiu com a produção de IL-6 nos três grupos

estudados, uma vez que não houve diferença estatística entre os valores da citocina obtidos nas culturas não estimuladas ou estimuladas com LPS e submetidas ou não ao tratamento com SB5 e SB50.

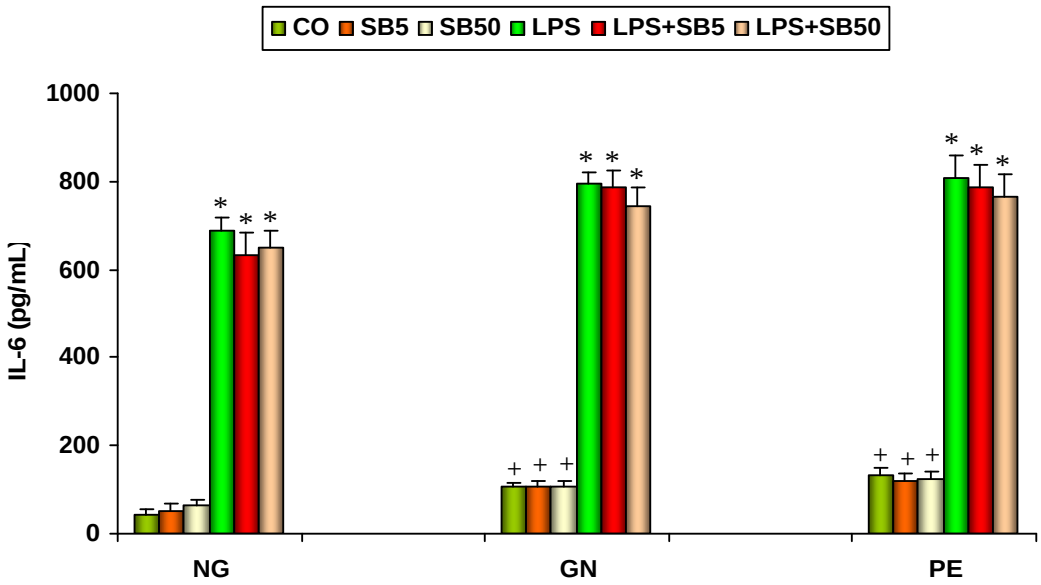



**Figura 5.** Efeito da silibinina (SB) sobre a produção de Interleucina-6 por monócitos de sangue periférico de mulheres normais não-grávidas (NG), de gestantes normais (GN) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS). Monócitos foram cultivados na ausência (CO) ou presença de silibinina nas concentrações de 5ug/mL (SB5) ou 50ug/mL (SB50) e de 10ug/mL de LPS. Os resultados estão expressos como média ± SD.

** (p<0,01) versus controle, SB50, SB5; + (p < 0,05) vesus NG (Anova)*

### 5.6. Produção de IL-10

Os níveis de IL-10 produzidos por monócitos de mulheres não-grávidas e de gestantes normais ou portadoras de pré-eclâmpsia, detectados no sobrenadante de cultura dessas células, submetidas ou não ao tratamento com silibinina e estimuladas ou não com LPS estão representados na Figura 6. A produção espontânea de IL-10, obtida a partir das células não estimuladas com LPS, tratadas ou não com silibinina, foi significativamente maior no grupo de gestantes normais quando comparado às mulheres não-grávidas e gestantes com pré-eclâmpsia. Quando as células foram estimuladas LPS, os níveis da citocina foram significativamente maiores em comparação às culturas controle não estimuladas. Não houve diferença entre os grupos quanto aos valores de IL-10 produzidos após estímulo com LPS, tanto nas culturas não tratadas com silibinina, como nas tratadas.

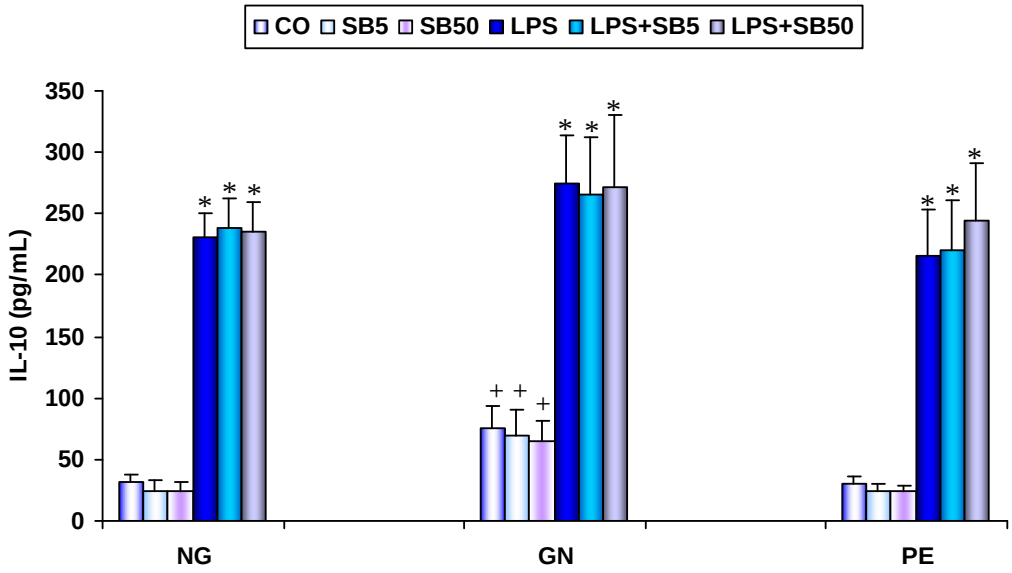



**Figura 6.** Efeito da silibinina (SB) sobre a produção de Interleucina-10 por monócitos de sangue periférico de mulheres normais não-grávidas (NG), de gestantes normais (GN) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS). Monócitos foram cultivados na ausência (CO) ou presença de silibinina nas concentrações de 5ug/mL (SB5) ou 50ug/mL (SB50) e de 10ug/mL de LPS. Os resultados estão expressos como média ± SD.

** (p<0,01) versus controle, SB50, SB5; + (p<0,05) versus NG, PE (Anova)*

### 5.7. Produção de IL-12

Os níveis endógenos de IL-12, produzidos por monócitos de gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia, foram significativamente maiores quando comparados com os obtidos de mulheres normais não-grávidas. A produção de IL-12 obtida após estímulo com LPS foi significativamente maior do que a produção endógena nos três grupos estudados, mostrando que a capacidade de produção da citocina está preservada.

A comparação entre os resultados obtidos após tratamento com silibinina, nas duas concentrações empregadas, e estímulo com LPS mostrou que esse flavonóide não interferiu na produção de IL-12 pelos monócitos dos três grupos avaliados. Entretanto, os níveis de IL-12 produzidos foram significativamente maiores nas gestantes normais quando comparados com as mulheres não-grávidas e gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

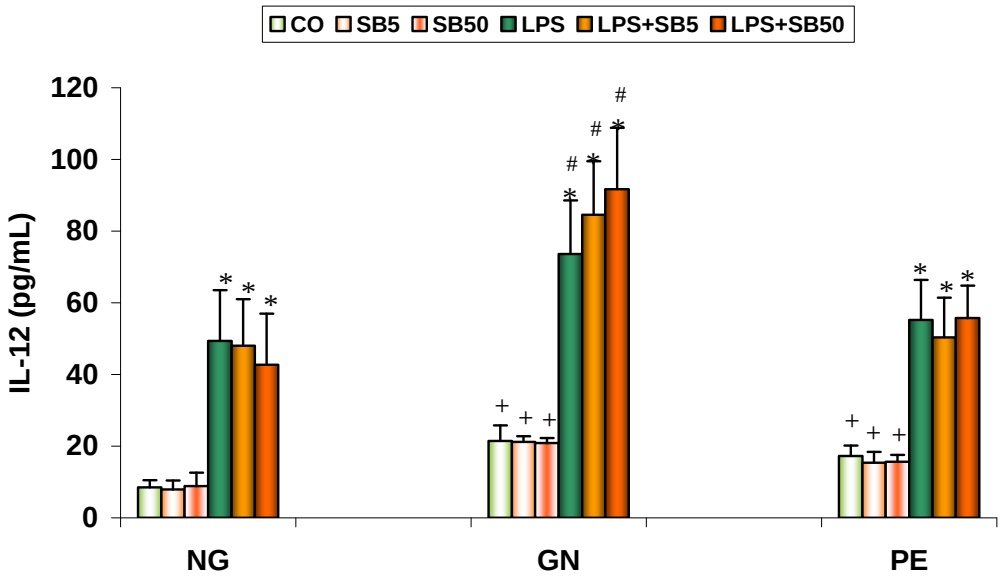



**Figura 7.** Efeito da silibinina (SB) sobre a produção de IL-12 por monócitos de sangue periférico de mulheres normais não-grávidas (NG), de gestantes normais (GN) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS). Monócitos foram cultivados na ausência (CO) ou presença de silibinina nas concentrações de 5ug/mL (SB5) ou 50ug/mL (SB50) e de 10ug/mL de LPS. Os resultados estão expressos como média ± SD.
** (p < 0,01) versus CO, SB5, SB50 (NG, GN, PE); + (p < 0,01) versus Co, SB5, SB50 (NG);*
*# (p < 0,01) versus LPS, LPS+SB5, LPS+SB50 (NG, PE) (Anova)*

### 5.8. Produção de IL-15

A análise do efeito da silibinina sobre a produção de IL-15 por monócitos de mulheres normais não-grávidas, de gestantes normais e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, estimulados ou não com LPS, não mostrou níveis detectáveis dessa citocina nos sobrenadantes das culturas de monócitos dos três grupos estudados. Os valores encontravam-se abaixo do limite de detecção do método.

### 5.9. Produção de GM-CSF

Os resultados da produção de GM-CSF por monócitos de mulheres não-grávidas, de gestantes normais e de gestantes com pré-eclâmpsia, representados na Figura 8, mostram que o estímulo das células com LPS induz a produção de níveis

significativamente maiores de GM-CSF em comparação com as culturas controle, não estimuladas.

A análise da produção endógena de GM-CSF, detectada na cultura de monócitos não estimulados com LPS, mostrou níveis significativamente maiores dessa citocina nos grupos de gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia, quando comparados às mulheres não-grávidas. O mesmo resultado foi observado com relação às culturas estimuladas com LPS. O tratamento das células com SB5 ou SB50 não apresentou efeito sobre a produção de GM-CSF pelas células dos grupos estudados, tanto nas culturas estimuladas com LPS, como nas não estimuladas.

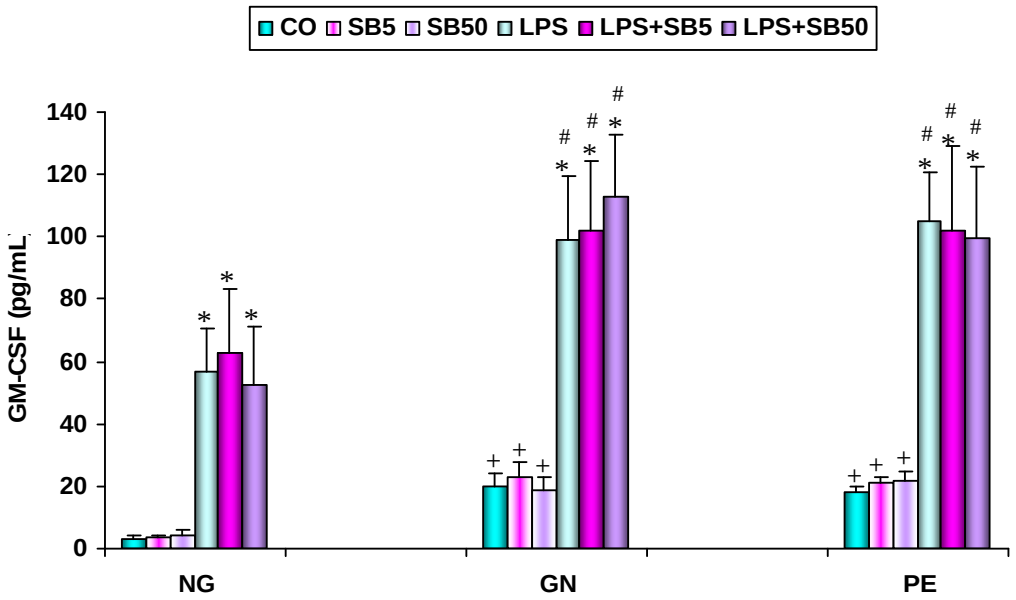



**Figura 8.** Efeito da silibinina (SB) sobre a produção de GM-CSF por monócitos de sangue periférico de mulheres normais não-grávidas (NG), de gestantes normais (GN) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS). Monócitos foram cultivados na ausência (CO) ou presença de silibinina nas concentrações de 5ug/mL (SB5) ou 50ug/mL (SB50) e de 10ug/mL de LPS. Os resultados estão expressos como média ± SD.

** (p<0,01) versus controle, SB50, SB5 (NG, GN, PE); + (p < 0,01) versus Co, SB5, SB50 (NG); # (p < 0,01) versus LPS, LPS+SB5, LPS+SB50 (NG) (Anova)*

## 5.10. Produção de TGF-$\beta_1$

Os níveis endógenos de TGF-$\beta_1$ e os estimulados por LPS foram significativamente maiores no grupo de gestantes normais em comparação com os obtidos em mulheres normais não-grávidas, quando os monócitos foram cultivados tanto na ausência como na presença de silibinina. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos nos grupos de gestantes normais e portadoras de pré-eclâmpsia. O tratamento das células com SB5 ou SB50 não apresentou efeito sobre a produção da citocina pelas células dos grupos estudados, tanto nas culturas estimuladas com LPS, como nas não estimuladas.

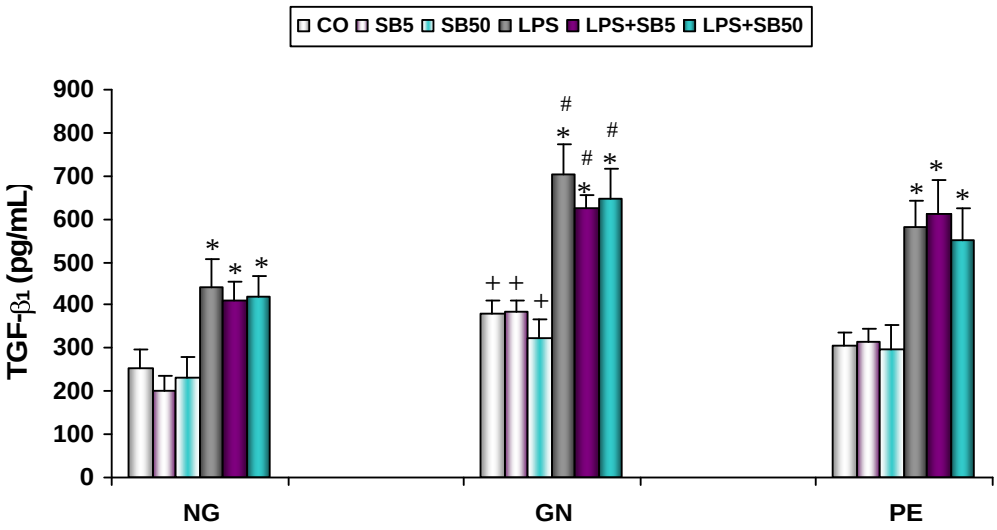



**Figura 9.** Efeito da silibinina (SB) sobre a produção de TGF-$\beta_1$ por monócitos de sangue periférico de mulheres normais não-grávidas (NG), de gestantes normais (GN) e de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) estimulados ou não com lipopolissacáride (LPS). Monócitos foram cultivados na ausência (CO) ou presença de silibinina nas concentrações de 5ug/mL (SB5) ou 50ug/mL (SB50) e de 10ug/mL de LPS. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SD.

***** *($p < 0,01$) versus CO, SB5, SB50 (NG, GN, PE); + ($p < 0,05$) vesus CO, SB5, SB50 (NG);*

*# ($p < 0,05$) versus LPS, LPS+SB5, LPS+SB50 (NG) (Anova)*

## 6. Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de estresse oxidativo e o efeito in vitro da silibinina sobre o estado de ativação de monócitos em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia. Para tanto foram utilizados monócitos isolados do sangue periférico de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, cujos controles foram gestantes normais e mulheres normais não-grávidas.

Para estudo do estresse oxidativo foi determinada a produção de ânion superóxido ($O_2^-$) pelos monócitos dos grupos estudados. O estado de ativação dessas células, em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, foi demonstrado pelo achado de níveis endógenos de $O_2^-$ liberados pelos monócitos significativamente maiores quando comparados com gestantes normais e mulheres normais não-grávidas. Quando essas culturas foram estimuladas com PMA houve aumento significativo na produção de $O_2^-$ pelos monócitos de mulheres normais não-grávidas e de gestantes normais, comparados com os níveis endógenos, enquanto nas gestantes com pré-eclâmpsia não houve diferença entre os níveis endógenos e os estimulados por PMA. Estes dados sugerem que os monócitos das gestantes com pré-eclâmpsia se encontram em maior estado de ativação e desta forma não respondem ao estímulo com o PMA. Nossos resultados estão de acordo com a literatura que mostra ativação de leucócitos na pré-eclâmpsia (SACKS et al., 1998; FAAS et al., 2008).

É sugerido que na pré-eclâmpsia ocorre uma resposta inflamatória generalizada, que desempenha papel importante na patogenia dessa doença (FAAS & SCHUILING, 2001). Os fatores responsáveis pela ativação dessa resposta inflamatória não são conhecidos, mas sugere-se que a placentação inadequada e a baixa perfusão placentária causariam a liberação de substâncias como fragmentos de membranas do sinciciotrofoblasto e DNA fetal solúvel, bem como de citocinas que ativariam sistemicamente células inflamatórias como monócitos, granulócitos e células endoteliais (KNIGHT et al., 1998; LO et al., 1999; BORZYCHOWSKI et al., 2006; GERMAIN et al., 2007; RUSTERHOLTZ et al., 2007). Assim, a resposta inflamatória generalizada da pré-eclâmpsia é caracterizada por células endoteliais

(AUSTGULEN et al., 1997) e células inflamatórias ativadas (SACKS et al., 1998).

Evidências mostram que o estresse oxidativo também pode estar envolvido na fisiopatologia da pré-eclâmpsia (KHARB et al., 2000; TAKAGI et al., 2004), uma vez que fatores citotóxicos podem agir de maneira sistêmica causando lesão do endotélio, fenômeno diretamente relacionado com a doença (REIN et al., 2003). A concentração plasmática de radicais livres, produtos de oxidação, se encontra elevada na pré-eclâmpsia, antecedendo o aparecimento de suas manifestações clínicas, mostrando correlação significativa com os valores de pressão arterial (WICKENS et al., 1981; ERSKINE et al., 1985) e com concentrações elevadas de gonadotrofina coriônica (KHARFI et al., 2005).

FAAS et al. (2008) mostraram que a incubação de células da linhagem monocítica MM6, equivalente a monócitos maduros, com plasma de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia grave induz maior produção de reativos intermediários do oxigênio do que o plasma de gestantes normais. Os autores sugerem que esses reativos, presentes no plasma de gestantes normais e com pré-eclâmpsia, podem ser responsáveis pela ativação de monócitos in vivo na gestação normal e na pré-eclâmpsia. Considerando que fatores presentes no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia não parecem ativar diretamente células endoteliais (DONKER et al., 2005), FAAS et al. (2008) sugerem que os monócitos ativados pelos fatores plasmáticos devam ser os iniciadores da resposta inflamatória generalizada observada na gestação normal e principalmente na pré-eclâmpsia.

Embora, na literatura exista grande variabilidade entre os métodos empregados para determinar a produção de $O_2^-$ e entre os diferentes tipos de células estudadas, nossos resultados concordam com os descritos por outros autores. A maior produção endógena de $O_2^-$ por monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia, observada no presente trabalho, também foi verificada por SACKS et al. (1998), pois estes demonstraram que monócitos e granulócitos de pacientes com pré-eclâmpsia produzem maiores quantidades de radicais livres do oxigênio em comparação com gestantes normais. Assim, na pré-eclâmpsia, a maior ativação dessas células é responsável pela maior produção desses radicais livres em comparação com gestantes normais e mulheres não-

grávidas. TSUKIMORI et al. (2008), estudando neutrófilos estimulados por n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine também verificaram maior produção de $O_2$- em mulheres com pré-eclâmpsia quando comparadas com os outros grupos.

A maior produção de $O_2^-$ por gestantes portadoras de pré-eclâmpsia sugere a ocorrência de estresse oxidativo nessas pacientes, esperando-se assim que esse estresse seja combatido por mecanismos anti-oxidantes. Em condições normais, o $O_2^-$ é metabolizado pela enzima superoxido dismutase (SOD) presente na membrana de eritrócitos (NEBOT et al., 1993; KUMAR & DAS, 2000). A SOD é responsável pela defesa contra O2-, que causa dano celular tanto in vivo como in vitro (KUMAR & DAS, 2000; 2002; SIKKEMA et al., 2001).

Nossos resultados mostram que a atividade da SOD, presente nos eritrócitos, foi significativamente maior nas gestantes com pré-eclâmpsia quando comparadas com gestantes normais e mulheres não-grávidas. Na literatura, os resultados da atividade da SOD em eritrócitos ou no plasma de gestantes pré-eclâmpsia são controversos. Alguns autores relatam aumento da atividade da SOD em eritrócitos de gestantes com pré-eclâmpsia (LLURBA et al., 2004; SHARMA et al., 2006; KRISHNA MOHAN & VENKATARAMANA, 2007) enquanto outros mostram diminuição dessa atividade (ILHAN et al., 2002; ATAMER et al., 2005; DORDEVIC et al., 2008) ou ainda resultados semelhantes da SOD em eritrócitos de gestantes com pré-eclâmpsia, gestantes normais e mulheres normais não-grávidas (DIRICAN et al., 2006). Essas diferenças podem estar relacionadas à heterogeneidade das manifestações e da gravidade da pré-eclâmpsia nas populações estudadas. KAUR et al. (2008) detectaram aumento marcante na atividade da SOD no plasma de grávidas normais e de gestantes com pré-eclâmpsia leve ou grave, quando comparadas com mulheres normais não-grávidas. Entretanto, encontraram redução significante na atividade da enzima em gestantes com pré-eclâmpsia leve e grave quando comparadas às grávidas normais. Segundo os autores, a diminuição dos níveis de SOD na pré-eclâmpsia grave pode estar associada aos efeitos deletérios da hipertensão. A deficiência da atividade dessa enzima seria resultante da incapacidade, das diferentes fontes celulares do organismo,

em neutralizar a produção contínua de $O_2^-$, resultando em níveis elevados desse radical livre. BERNARDI et al. (2008) sugerem que na pré-eclâmpsia a diminuição significativa de SOD no plasma associada ao aumento de arginase pode causar diminuição de óxido nítrico e do estresse oxidativo, provocando assim lesão microvascular e disfunção endotelial.

Em conclusão, os níveis elevados da atividade da SOD nas gestantes com pré-eclâmpsia, observados no presente estudo, podem representar a adaptação do organismo materno ao estresse oxidativo ou ainda, um mecanismo compensatório para se livrar do excesso de $O_2^-$, devido à intensa ativação das células imunes ou endoteliais.

A análise do efeito da silibinina sobre a produção de $O_2^-$ mostra que, nos grupos estudados, a concentração de 50ug/mL de silibinina inibiu significativamente tanto a produção espontânea quanto a estimulada desse metabólito, enquanto a dose de 5ug/mL não apresentou esse efeito. Portanto, os resultados mostram que a inibição da liberação dos níveis de $O_2^-$ pela silibinina, em monócitos estimulados ou não com PMA, é dose-dependente.

O efeito inibidor da silimarina e seus componentes ativos sobre o metabolismo oxidativo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) humanos, obtidos do sangue periférico, foi demonstrado por VARGA et al. (2001). Os autores verificaram que os diferentes componentes da silimarina inibem a liberação de $O_2^-$ e a produção de $H_2O_2$ por PMN estimulados com PMA, sugerindo que a silimarina tem propriedades anti-oxidantes sobre o metabolismo oxidativo dessas células. Posteriormente, analisando a estrutura molecular responsável pela propriedade anti-oxidante da silibinina, esses autores (VARGA et al., 2006) verificaram que esse flavonoide e seus análogos estruturais têm efeito inibitório sobre a liberação de $O_2^-$ via inibição da translocação da proteína C quinase em neutrófilos estimulados por PMA. A literatura mostra efeito inibidor dose-dependente da silibinina sobre a formação de $O_2^-$ por células de Kupffer estimuladas com PMA. (DEHMLOW et al., 1996). ZIELINSKA-PRZYJEMSKA & WIKTOROWICZ (2006) demonstraram que a silidianina, outro componente ativo da silimarina, está associado a diminuição significativa da produção de $O_2^-$ pelas células polimorfonucleares.

Outro efeito anti-oxidante importante da silibinina é sua capacidade de aumentar ou restaurar a atividade de SOD em linfócitos e eritrócitos de pacientes com doenças hepáticas como a cirrose alcoólica crônica e hepatite crônica pelo vírus tipo C (FEHÉR et al., 1987; 1989; WELLINGTON & JARVIS, 2001; POLYAK et al., 2007), sugerindo que a atividade anti-oxidante pode ser um dos principais fatores da ação hepatoprotetora da silibinina.

O efeito da silibinina sobre o metabolismo oxidativo de monócitos não está descrito na literatura. Assim, os resultados do presente trabalho mostram, pela primeira vez, o efeito inibidor desse flavonoide sobre a produção de $O_2^-$ in vitro. Estudos futuros, usando silibinina em modelos experimentais de pré-eclâmpsia, poderão avaliar seu papel no tratamento do estresse oxidativo descrito nessa patologia.

Os resultados referentes à produção de citocinas mostram que houve aumento significativo dos níveis endógenos de TNF-$\alpha$ no grupo de gestantes com pré-eclâmpsia, quando comparado aos grupos de mulheres normais não-grávidas e grávidas normais, tanto nas culturas tratadas com as duas concentrações de silibinina como nas não tratadas, demonstrando que estas células se encontram ativadas endogenamente nas gestantes com pré-eclâmpsia. Esses níveis endógenos de TNF-$\alpha$ e a produção estimulada com LPS detectados em gestantes normais e com pré-eclâmpsia confirmam pesquisa realizada em nosso laboratório, que mostra que monócitos de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia encontram-se ativados in vivo, produzindo níveis mais elevados de TNF-$\alpha$ (PERAÇOLI et al., 2007). A concentração de TNF-$\alpha$ no plasma e sua produção por monócitos de gestantes hipertensas, avaliadas no terceiro trimestre da gestação e no puerpério, demonstram que gestantes com pré-eclâmpsia apresentam níveis plasmáticos de TNF-$\alpha$ e de ácido úrico significativamente maiores, quando comparados aos de gestantes normais, havendo correlação entre esses parâmetros. Os níveis endógenos de TNF-$\alpha$ produzidos por monócitos foram maiores em gestantes com pré-eclâmpsia e, a capacidade de produção da citocina por essas células permaneceu inalterada após estímulo com LPS (PERAÇOLI et al., 2007). A maior produção de TNF-$\alpha$ em gestantes com pré-eclâmpsia, observada no presente estudo, está em acordo com resultados de outros autores

(BECKMANN et al., 2004) e sugere que, os efeitos deletérios das altas concentrações circulantes dessa citocina podem estar associados às manifestações mais graves da pré-eclâmpsia.

Níveis elevados de TNF-$\alpha$ são descritos no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia, estando associados com a patogênese da doença (KUPFERMINC et al., 1994; VINCE et al., 1995; CONRAD et al., 1998; MUNNO et al., 1999; ANIM-NYAME et al., 2003; SHARMA et al., 2007). A literatura também relata aumento da expressão de TNF-$\alpha$ em placentas de gestantes com pré-eclâmpsia quando comparado com placentas normais (RINEHART et al., 1999; WANG & WALSH, 1996). Em trabalho anterior, demonstramos que níveis elevados de TNF-$\alpha$, detectados em homogenatos de placenta de gestantes com pré-eclâmpsia, estão associados com a gravidade da doença e com os valores de proteinúria (LOURENÇO et al., 2007). Esses dados sugerem que o aumento de TNF-$\alpha$ pode contribuir para a disfunção endotelial generalizada característica da pré-eclâmpsia (CHEN et al., 1996; KHAN et al., 2005). Além disso, SEKI et al. (2007) verificaram que nessa doença, monócitos ativados produzem altos níveis de TNF-$\alpha$ que induzem apoptose e inibem, in vitro, a proliferação de linhagem de células trofoblásticas de maneira dose-dependente, podendo assim ser considerada a principal citocina envolvida na patogênese da pré-eclâmpsia.

A avaliação dos níveis endógenos de outras citocinas inflamatórias produzidas por monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia, gestantes normais e mulheres normais não-grávidas mostrou produção significativamente maior de IL-6, IL-12 e GM-CSF nas gestantes normais e nas com pré-eclâmpsia. Esses resultados mostram que os monócitos dessas gestantes se encontram ativados, produzindo concentrações significativamente maiores dessas citocinas em relação ao grupo de mulheres não-grávidas.

A maior ativação de leucócitos na gestação normal e na portadora de pré-eclâmpsia é descrita pela literatura (REDMAN et al., 1999; SAITO et al., 2007). Segundo SACKS et al. (1999), na gestação normal ocorre aumento do número de monócitos e granulócitos desde o primeiro trimestre até o final da gestação, ao contrário do sistema imune adaptativo, cuja reatividade encontra-se diminuída durante a gestação. Há evidências de que componentes da

imunidade inata estejam ativados sistemicamente, representando um mecanismo de defesa inata contra infecções (SACKS et al., 1999). Portanto, a pré-eclâmpsia parece ser o resultado de uma resposta inflamatória materna, que inclui ativação de células inflamatórias como monócitos e granulócitos, bem como ativação de células endoteliais, componentes do sistema inflamatório (OIAN et al., 1985; HAEGER et al., 1996; REDMAN et al., 2003). Na gestação normal, alterações significativas de leucócitos intravasculares levaram REDMAN et al. (1999) a sugerirem que, a pré-eclâmpsia é uma doença resultante da exacerbação de um processo inflamatório generalizado, natural da gravidez.

Segundo alguns autores, níveis elevados de IL-6 detectados no soro de gestantes com pré-eclâmpsia podem explicar o estado inflamatório intenso observado nessa patologia e ser o resultado da ativação de leucócitos envolvidos na disfunção endotelial (GREER et al., 1994; JONSSON et al., 2006; LUPPI et al., 2006; CASART et al., 2007; SHARMA et al., 2007). LUPPI & DELOIA (2006) detectaram maior expressão intracitoplasmática de IL-6 em monócitos de gestantes com pré-eclâmpsia, sugerindo que os monócitos circulantes são a principal fonte de citocinas inflamatórias nessa patologia.

Enquanto na gestação normal níveis elevados de IL-6 representam uma resposta inflamatória sistêmica favorável ao organismo materno, na pré-eclâmpsia, a associação de níveis elevados de IL-6 e de TNF-$\alpha$ pode estar envolvida na patogênese da doença. A ativação excessiva de monócitos e granulócitos intravasculares e de macrófagos, descrita na pré-eclâmpsia, sugere que a ativação do sistema imune inato pode também causar problemas na progressão da gestação.

A literatura mostra resultados conflitantes em relação aos níveis de IL-12 sérico ou plasmático, produzidos por células mononucleares de sangue periférico de gestantes normais e com pré-eclâmpsia. Valores aumentados de IL-12 no soro ou no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia são detectados por vários autores (DUDLEY et al., 1996; DANIEL et al., 1998; MANSOURI et al., 2007). DUDLEY et al. (1996) determinaram a concentração IL-12 pela presença da subunidade p40 e do dímero p75 da citocina, e observaram que as maiores concentrações de IL-12p40 estavam presentes em gestantes com pré-eclâmpsia grave e síndrome HELLP. A IL-12p75 foi observada em 90%

dessas pacientes, sugerindo que a IL-12 parece contribuir com as alterações imunológicas presentes nessas intercorrências da gestação. Por outro lado, outros autores não encontraram diferença entre gestantes normais e com pré-eclâmpsia com relação aos níveis de IL-12 presentes no soro (JONSSON et al., 2006).

Concentrações de IL-12, produzidas por células mononucleares de sangue periférico, são semelhantes em gestantes com pré-eclâmpsia leve e gestantes normais, e apresentam-se elevadas em gestantes com pré-eclâmpsia grave, demonstrando ativação de monócitos nestas últimas e contribuindo para a dominância de padrão Th1 de resposta na pré-eclâmpsia (SAKAI et al., 2002). A semelhança entre grávidas normais e com pré-eclâmpsia, em relação à produção de IL-12, foi demonstrada na resposta de células mononucleares estimuladas ou não in vitro com PPD, toxoide tetânico ou antígenos paternos (JONSSON et al., 2005). van NIEUWENHOVEN et al. (2008), determinando a expressão de IL-12 por monócitos de sangue periférico de grávidas normais e com pré-eclâmpsia, mostraram redução significativa da percentagem de células produtoras da citocina em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

A discrepância entre os resultados da literatura em relação à produção de IL-12 por células do sangue periférico e sua presença no plasma ou soro de pacientes com pré-eclâmpsia pode ser explicada pela sensibilidade dos diferentes métodos empregados na determinação da citocina, além da variabilidade nos critérios de gravidade definidos para classificação das pacientes. Nossos resultados, mostrando que essa citocina se encontra aumentada na gestação normal e na pré-eclâmpsia concordam com a hipótese de que a IL-12 é uma citocina inflamatória, produzida principalmente por células da imunidade inata, e que se encontra ativada na gestação normal e em maior grau na pré-eclâmpsia (FAAS & SCHUILIGAN, 2001; BREWSTER et al., 2008). Além disso, a resposta inflamatória, que aumenta com o avanço da gestação, tanto na gestação normal como na pré-eclâmpsia, pode explicar o aparecimento tardio da pré-eclâmpsia na ausência de patologia placentária (BREWSTER et al., 2008).

Embora HAYASHI et al. (2004) observaram níveis elevados de GM-CSF no soro e placenta de gestantes com pré-eclâmpsia em relação às

gestantes normais, no presente estudo a produção de GM-CSF não diferenciou gestantes normais e com pré-eclâmpsia. A diferença entre estes resultados e os de HAYASHI et al (2004) pode ser atribuída ao emprego de diferentes ensaios para determinação da citocina. Além disso, durante a gestação, os níveis séricos de GM-CSF podem resultar da produção de GM-CSF por diferentes tecidos.

A avaliação das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF-$\beta_1$ mostrou que seus níveis endógenos foram maiores nas gestantes normais. A produção de IL-10 nessas gestantes foi significativamente maior do que em mulheres normais não-grávidas e gestantes com pré-eclâmpsia, enquanto os valores de TGF-$\beta_1$ foram significativamente maiores na gestação normal, quando comparados aos produzidos por mulheres não-grávidas. A maior produção dessas citocinas na gestação normal pode representar o perfil Th2 de resposta que se desenvolve durante a gestação, para minimizar os efeitos deletérios de uma resposta inflamatória excessiva.

No presente estudo a maior produção de IL-10 por monócitos de gestantes normais corrobora os achados da literatura, que relatam maior produção de IL-10 em gestantes normais e queda da produção dessa citocina nas gestantes com pré-eclâmpsia (AZIZIEH et al., 2005; JONSSON et al., 2005; BORECKCI et al., 2007). Nas gestantes normais, os níveis endógenos elevados de IL-10 sugerem um mecanismo de controle da produção de TNF-$\alpha$ por essas células, ao serem submetidas à estimulação crônica durante a gestação, na tentativa de controle da reação inflamatória materna. A menor produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico não estimuladas ou ativadas por mitógenos também foi observada na pré-eclâmpsia (DARMOCHWAL-KOLARZ et al., 2002; ORANGE et al., 2003; AZIZIEH et al., 2005).

A IL-10 exerce potente efeito anti-inflamatório, considerado importante na manutenção da gestação (CHAOUAT et al., 1995; HANNA et al., 2000). JOHNSON et al. (2005) avaliaram a produção espontânea de IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13 e TNF-$\alpha$ por monócitos de gestantes normais e com pré-eclâmpsia em resposta a antígenos paternos e verificaram diminuição significativa da produção de IL-10, principalmente frente a estímulo com

antígenos paternos, mostrando uma resposta materna seletiva aos antígenos fetais específicos. Assim, o aumento da resposta inflamatória na pré-eclâmpsia pode ser consequente à diminuição dos níveis de IL-10, uma vez que essa citocina regula a produção de citocinas inflamatórias, como TNF-$\alpha$, por monócitos (NIHO et al., 1998).

No presente estudo, a análise da capacidade de produção das diferentes citocinas por monócitos estimulados com LPS mostrou que nos grupos estudados essa atividade encontra-se preservada. Para todas as citocinas avaliadas (TNF-$\alpha$, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF e TGF-$\beta_1$) os níveis produzidos após estímulo com LPS foram significativamente maiores do que a produção pelas células não estimuladas. Por outro lado, após estímulo com LPS, os níveis de GM-CSF foram significativamente maiores nas gestantes normais e nas com pré-eclâmpsia, quando comparadas com as mulheres normais não-grávidas. Por outro lado, foi observada maior produção de IL-12 nas gestantes normais em relação às gestantes com pré-eclâmpsia e às mulheres normais não-grávidas, e a produção de TGF-$\beta_1$ foi significativamente maior em gestantes normais do que em mulheres não-grávidas. Nossos resultados sugerem que a capacidade de produção dessas citocinas está aumentada, principalmente em gestantes normais, e são parcialmente concordantes com a literatura. Segundo BREWSTER et al. (2008a), a disfunção inflamatória envolvida na fisiopatología da pré-eclâmpsia pode ser demonstrada pelo aumento da capacidade de produção das citocinas IL-1$\beta$, IL-2, IL-10, G-CSF, IFN-$\gamma$ e TNF-$\alpha$ por monócitos estimulados com LPS, contrariando a tradicional dicotomia Th1/Th2 descrita na pré-eclâmpsia. Entretanto, é importante salientar que o estudo da capacidade de produção de citocinas por monócitos, estimulada por LPS, nem sempre retrata o estado de ativação dessas células na pré-eclâmpsia. Nesse sentido, os resultados mais adequados para se correlacionar a gravidade da pré-eclâmpsia com o perfil ou com o nível de citocinas são os obtidos da produção endógena ou não estimulada dessas células.

Os resultados do presente estudo frente ao efeito da silibinina, em relação a produção de citocinas por monócitos estimulados ou não com LPS mostraram que as duas concentrações utilizadas não interferiram com os níveis

de IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF e TGF-β1, produzidos por células dos grupos estudados. Esse flavonoide apresentou efeito inibidor apenas sobre a produção de TNF-α. O tratamento das células com silibinina na concentração de 50ug/ml inibiu significativamente a produção de TNF-α pelas células das gestantes com pré-eclâmpsia, porém não interferiu na produção endógena por monócitos de gestantes normais e mulheres não-grávidas. Observa-se que o tratamento das células com silibinina, nas duas concentrações empregadas, causou efeito inibidor significativo sobre a produção de TNF-α quando os monócitos foram estimulados com LPS. A inibição pode ser melhor observada quando os níveis de TNF-α estavam elevados, como na produção endógena pelas células de gestantes com pré-eclâmpsia e na produção estimulada por LPS, nos três grupos (Figuras 2 e 3).

A atividade anti-inflamatória da silibinina sobre a produção de TNF-α induzida por LPS já foi demonstrada por trabalho desenvolvido em nosso laboratório. BANWWART et al. (2008), avaliando o efeito da silibinina sobre o metabolismo oxidativo de monócitos humanos, obtidos de indivíduos saudáveis, mostraram que esse flavonoide inibe, de maneira dose-dependente, a produção de TNF-α induzida por LPS e a liberação de $H_2O_2$ por monócitos estimulados com PMA. Estudos in vivo e in vitro mostraram que a silibinina atua principalmente inibindo a produção e expressão de TNF-α em humanos e em modelos experimentais (SCHUMANN et al., 2003; AGARWAL et al., 2006; FALASCA et al., 2008; SHANMUGAM et al., 2008). Na avaliação do efeito protetor da silimarina em modelo experimental de sepse, induzida por LPS em camundongos, KANG et al. (2004) demonstraram que a administração in vivo do flavonoide aumentou a sobrevida dos animais. O cultivo in vitro de macrófagos peritoniais desses camundongos com diferentes doses de silimarina e LPS revelou efeito inibidor dose-dependente do flavonóide sobre a produção de IL-1β e $PGE_2$, e sobre a expressão de mRNA para IL-1β e COX-2. O efeito antiinflamatório e protetor na sepse apresentado pelo favonoide é mediado, ao menos em parte, por sua ação inibidora sobre a produção de citocinas e mediadores inflamatórios.

Estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no efeito anti-inflamatório da silibinina apontam para o efeito inibidor sobre o fator de

transcrição nuclear kappa B (NF-kB), uma proteína composta por duas subunidades p50 e p65, capaz de se ligar ao DNA e agir como fator de transcrição em vários genes envolvidos nos processos inflamatórios, citoprotetores e carcinogênicos (KANG et al., 2002; KREN and WALTEROVÁ, 2005; PRADHAN & GIRISH, 2006). Estudo realizado por LEE et al. (2007) mostrou que a silibinina polariza a resposta Th1/Th2 através da inibição da função imunomodulatória de células dendríticas. A incubação dessas células com o flavonoide suprimiu a expressão das moléculas CD80, CD86, moléculas MHC classes I e II e IL-12 nessas células. Além disso, a silibinina inibiu a translocação nuclear da subunidade p65 do NF-$\kappa$B nas células estimuladas com LPS. Segundo os autores, as funções imunofarmacológicas da silibinina poderiam ser úteis no desenvolvimento de terapêutica adjuvante para doenças agudas ou crônicas.

Assim, os resultados mais recentes da literatura apontam para um efeito anti-inflamatório e anti-oxidante da silibinina, principalmente por inibir fatores de transcrição inflamatórios, envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN-$\gamma$, IL-1$\beta$, IL-2 e TNF-$\alpha$, liberação de radicais livres do oxigênio e nitrogênio, além de expressão de moléculas envolvidas na resposta inflamatória (SCHUMANN et al., 2003; AGARWAL et al., 2006; PRADHAN & GIRISH, 2006; LEE et al., 2007).

Os estudos empregando silibinina para tratamento de doenças inflamatórias humanas, como cirrose alcoólica e hepatite crônica viral tipo C mostram resultados promissores e ausência de efeitos colaterais (FEHÉR et al., 1987; 1989; POLYAK et al., 2007; FALASKA et al., 2008). Assim, o emprego desse flavonoide poderia ser importante como terapêutica adjuvante no tratamento das manifestações inflamatórias exacerbadas da pré-eclâmpsia.

## 7. Conclusões

O presente estudo permitiu concluir que, em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia:

**1.** Monócitos se encontram ativados, produzindo níveis mais elevados de ânion superóxido e de TNF-$\alpha$;

**2.** A maior atividade da enzima superóxido dismutase, presente em eritrócitos, pode participar do mecanismo de adaptação do organismo materno ao estresse oxidativo, decorrente dos altos níveis de ânion superóxido produzido pelas células dessas pacientes;

**3.** Níveis elevados de IL-6, IL-12 e GM-CSF, produzidos por monócitos e semelhantes aos de gestantes normais, indicam que essas células se encontram ativadas durante a gestação.

**4.** A menor produção endógena de IL-10 associada à maior produção de TNF-$\alpha$ por monócitos, quando comparada com gestantes normais, sugere que a resposta inflamatória mais intensa na pré-eclâmpsia seria decorrente da diminuição dos níveis de IL-10;

**5.** A maior produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, após estímulo dos monócitos com LPS, sugere que a capacidade de produção de citocinas se encontra preservada e semelhante às gestantes normais e mulheres normais não-grávidas;

**6.** A silibinina inibiu tanto a produção endógena de TNF-$\alpha$ quanto a estimulada por LPS, porém não teve efeito sobre a produção de IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF e TGF-$\beta_1$;

**7.** A silibinina, por suas propriedades anti-oxidante e anti-inflamatória, inibiu a lilberação de ânion superóxido e a produção de TNF-$\alpha$.

## 8. Referências Bibliográficas*

Adams KM, Mandel LS, Guthrie KA, Atkinson MW. Interleukin-18 in the plasma of women with preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2003; 188:1234-7.

Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. Anticancer Res. 2006; 26:4457-98.

Anim-Nyame N, Gamble J, Sooranna SR, Johnson MR, Steer PJ. Microvascular permeability is related to circulating levels of tumor necrosis factor-alpha in pre-eclampsia. Cardiovasc Res 2003; 58:162-9.

Arriaga-Pizano L, Jimenez-Zamudio L, Vadillo-Ortega F, Martinez-Flores A, Herrerias-Canedo T, Hernandez-Guerrero C. The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the choriodecidual and fetal compartments. J Soc Gynecol Investig. 2005; 12:335-42.

Atamer Y, Koçyigit Y, Yokus B, Atamer A, Erden AC. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2005; 119:60-6.

Austgulen R, Lien E, Vince G, Redman CWG. Increased maternal plasma levels of soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) in pre-eclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1997;71:53-8.

Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol 2005; 54: 30-7.

* Referências bibliográficas elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submetted to biomedical Journal Ann Intern Méd 1997; 126:36-47.

Bannwart CF, Peraçoli, J.C, Nakaira ET, Peraçoli MTS. Inhibitory effect of silibinin on tumor necrosis factor-alpha and hydrogen peroxide production by human monocytes. J Ethnopharmacol 2008 (*in press*).

Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86:2505-12.

Beckmann I, Efraim SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. Hypertens Pregnancy. 2004; 23:319-29.

Bernardi F, Constantino L, Machado R, Petronilho F, Dal-Pizzol F. Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in pre-eclamptic women. J Obstet Gynaecol Res. 2008; 34:957-63.

Bilodeau JF, Hubel CA. Current concepts in the use of antioxidants for treatment of pré-eclâmpsia. JObstet Gynaecol Can 2003; 25: 742-50.

Borekci B, Aksoy H, Al RA, Demircan B, Kadanali S. Maternal serum interleukin-10, interleukin-2 and interleukin-6 in pre-eclampsia and eclampsia. Am J Reprod Immunol 2007; 58:56-64.

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

Bosisio E, Benelli C, Pirola O. Effect of the flavanolignans of Silybum marianum L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. Pharmacol Res. 1992;25:147-54.

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

Brewster JA, Orsi NM, Gopichandran N, 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;140:21-6.

Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. J Soc Gynecol Investig. 2004; 11:342-52.
Burton GJ, Hung TH. Hypoxia-reoxygenation: a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. Fetal Mat Med Rev 2003; 14:97-117.

Carini R, Comoglio A, Albano E, Poli G. Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016. Biochem Pharmacol. 1992; 43:2111-5.

Cassart YC, Tarrazzi K, Camejo MI. Serum levels of inteleukin-1 beta and human chorionic gonadrotropin in pre-eclamptic and normal pregnancy. Gynecol Endocrinol 2007; 23:300-3.

Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-g. J Immunol. 1995;154:4261-8.

Chen G, R Wilson, Wang SH, Zheng HZ, Walker JJ, McKillop JH. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. Clin Exp Immunol. 1996;104:154-9.

Comelli MC, Mengs U, Schneider C, Prosdocimi M. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. Integr Cancer Ther. 2007; 6:120-9.

Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. Am J Reprod Immunol 1998; 40: 102-11.

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; 39:376-80.

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; 48:381-6.

Dehmlow C, Murawski N, Groot H. Scavening of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. Life Sci 1996; 58:1591-600.

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

De La Puerta R, Martinez E, Bravo L, Ahumada MC. Effect of silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. J Pharm Pharmacol. 1996; 48:968-70.

Dirican M, Safak O, Uncu G, Sarandöl E. Susceptibility of red blood cell lipids to in vitro oxidation and antioxidant status in preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008;140:158-64.

Donker RB, Molema G, Faas MM, et al. Absence of in vivo generalized pro-inflammatory endothelial activation in severe, early-onset preeclampsia. J Soc Gynecol Investig 2005;12:518-28.

Dordević NZ, Babić GM, Marković SD, Ognjanović BI, Stajn AS, Zikić RV, Saicić ZS. Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclampsia in women. Reprod Toxicol. 2008; 25:213-8.

Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Varner MW, Gately M. Elevations of serum interleukin-12 concentrations in women with severe pre-eclampsia and HELLP syndrome. J Reprod Immunol. 1996; 31:97-107.

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; 264:182-5.

Erskine KJ, Iversen SA, Davies R. An altered ratio of 18:2 (9,11) to 18:2 (9,12) linoleic acid in plasma phospholipids as a possible predictor of pre-eclampsia. Lancet 1985; i:554-5.

Faas M, Schuiling GA. Pre-eclampsia and the inflammatory response. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001; 95:213-7.

Faas MM, Donker RB, van Pampus MG, Huls AM, Salomons J, de Vos P, Aarnoudse JG. Plasma of pregnant and preeclamptic women activates monocytes in vitro. Am J Obstet Gynecol. 2008; 199:84.e1-8.

Falasca K, Ucciferri C, Mancino P, Vitacolonna E, De Tullio D, Pizzigallo E, Conti P, Vecchiet J. Treatment with silybin-vitamin E-phospholipid complex in patients with hepatitis C infection. J Med Virol. 2008; 80:1900-6.

Fehér J, Láng I, Nékám K, Csomós G, Müzes G, Deák G. Effect of silibinin on the activity and expression of superoxide dismutase in lymphocytes from patients with chronic alcoholic liver disease. Free Radic Res Commun. 1987; 3:373-7.

Fehér J, Cornides A, Pál J, Láng I, Csomós G. Liver cell protection in toxic liver lesion. Acta Physiol Hung. 1989; 73:285-91.

Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H, Frank H, Benda L, Lochs H, Meryn S, Base W, Schneider B. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. J Hepatol 1989; 9:105-13.

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

Greer IA, Lyall F, Perera T, Boswell F, Macara LM. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? Obstet Gynecol. 1994; 84:937-40.

Gupta OP, Sing S, Bani S, Sharma N, Malhotra S, Gupta BD, Banerjee SK, Handa SS. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of silymarin acting through inhibition of 5-lipoxygenase. Phytomedicine 2000; 7:21-4.

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

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

Hanna, N., Hanna, I., Hleb, M., Wagner, E., Dougherty, J., Balkundi, D., Padbury, J.F., Sharma, S., 2000. Gestational age-dependent expression of interleukin-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. J. Immunol. 164, 5721–5728.

Hayashi M, Hamada Y, Ohkura T. Elevation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the placenta and blood in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2004;190: 456-61.

Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. J Immunol. 1999; 163:3491-5.

Howie PW, McNeilly AS. Effect of breast-feeding patterns on human birth intervals. J Reprod Fertil 1982; 65:545-57.

Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. Am J Pathol. 2004;164:1049-61.

Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, Wada S, Yamamoto K, Kishimoto T. TNF alpha, IL-1 beta and IL-6 production by peripheral blood monocytes in patients with renal cell carcinoma. Anticancer Res. 2000; 20:317-21.

Ilhan N, Ilhan N, Simsek M. The changes of trace elements, malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in pregnancy with or without pré-eclâmpsia. Clin Biochem 2002; 35: 393-7.

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

Johnson VJ, He Q, Osuchowski MF, Sharma RP. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in Balb/c mice: Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. Planta Med 2003; 69: 44-9.

Jonsson Y, Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Nieminen K, Ekerfelt C. Indications of an altered immune balance in preeclampsia: a decrease in in vitro secretion of IL-5 and IL-10 from blood mononuclear cells and in blood basophil counts compared with normal pregnancy. J Reprod Immunol. 2005; 66:69-84.

Jonsson Y, Rubèr M. Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Erneredh J, Ekerfelt C. Cytokine mapping of sera from women with pré-eclâmpsia and normal pregnancies. J Reprod Immunol 2006; 70:83-91.

Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Pharmacol Exp Ther 2002; 302:138-44.
Kang JS, Jeon YJ, Park SK, Yang KH, Kim HM. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1beta and prostaglandin E2 synthesis by silymarin. Biochem Pharmacol. 2004; 67:175-81.

Kaur G, Mishra S, Sehgal A, Prasad R. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. Mol Cell Biochem. 2008; 313:37-44.

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

Kharb S, Gulati N, Singh V, Singh GP. Superoxide anion formation and glutathione levels in patients with preeclampsia. Gynecol Obstet Invest 2000; 49:28-30.

Kharfi A, Giguère Y, Sapin V, Massé J, Dastugue B, Forest JC. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. Clin Biochem. 2003; 36:323-31.

Kharfi A, Giguère Y, De Grandpré P, Moutquin JM, Forest JC. Human chrorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. Clin Biochem 2005; 38:717-21.

Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. Br J Obstet Gynaecol. 1998; 105:632-40.

Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin: new effects and applications. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2005; 149:29-41.

Krishna Mohan S, Venkataramana G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with pregnancy--induced hypertension. Indian J Physiol Pharmacol. 2007 Jul-Sep;51(3):284-8.

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

Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Tamura RK, Rehnberg KA, Socol ML. Immunoreactive tumor necrosis factor-alpha is elevated in maternal plasma but undetected in amniotic fluid in the second trimester. Am J Obstet Gynecol 1994; 171: 976-9.

Kusanovic JP, Romero R, Hassan SS, Gotsch F, Edwin S, Chaiworapongsa T, Erez O, Mittal P, Mazaki-Tovi S, Soto E, Than NG, Friel LA, Yoon BH, Espinoza J. Maternal serum soluble CD30 is increased in normal pregnancy, but decreased in preeclampsia and small for gestational age pregnancies. J Matern Fetal Neonatal Med. 2007; 20:867-78.

Kumar CA, Das UN. Lipid peroxides, anti-oxidants and nitric oxide in patients with pre-eclampsia and essential hypertension. Med Sci Monit. 2000; 6:901-7.

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

Kvasnicka F, Biba B, Sevcik R, Voldrich M, Kratka J. Analysis of the active components of silymarin. J Chromatogr 2003; 990: 239-45.

Lee JS, Kim SG, Kim HK, Lee TH, Jeong YI, Lee CM, Yoon MS, Na YJ, Suh DS, Park NC, Choi IH, Kim GY, Choi YH, Chung HY, Park YM. ilibinin polarizes Th1/Th2 immune responses through the inhibition of immunostimulatory function of dendritic cells. J Cell Physiol. 2007; 210:385-97.

Lelli G, Montanari M, Gilli G, Scapoli D, Antonietti C, Scapoli D. Treatment of the cancer anorexia-cachexia syndrome: a critical reappraisal. J Chemother 2003; 15: 220-5.

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group, Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. N Engl J Med 2006; 7:992-1005.

Lo YM, Leung TN, Tein MS, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. Clin Chem 1999; 45:184-8.

Lourenço NCV, Peraçoli JC, Cristofalo R, Silva MDP, Silva MG, Peraçoli MTS. Placental imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. J Reprod Immunol. 2007; 75:A14-A15.

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

Luppi P, Tse H, Lain KY, Markovic N, Piganelli JD, DeLoia JA. Preeclampsia activates circulating immune cells with engagement of the NF-kappaB pathway. Am J Reprod Immunol. 2006; 56:135-44.

Llurba E, Gratacos E, Martin-Gallan P, Cabero L, Dominguez C. A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. Free Radic Biol Med 2004; 37:557–70.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. Silymarin suppress TNF-induced activation of NF-kB, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. J Immunol 1999; 163:6800-9.

Mansouri R, Akbari F, Vodjgani M, Mahboudi F, Kalantar F, Mirahmadian M. Serum cytokines profiles in Iranian patients with preeclampsia. Iran J Immunol. 2007; 4:179-85.

Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y, Sharma S. Immunology of preeclampsia. Chem Immunol Allergy. 2005; 89:49-61.

Meekins JW, McLaughlin PJ, West DC, McFadyen IR, Johnson PM. Endothelial cell activation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and the development of pre-eclampsia. Clin Exp Immunol. 1994; 98:110-4.

Mourelle M, Muriel P, Favari L, Franco T. Prevention of CCL4-induced liver cirrhosis by silymarin. Fundam Clin Pharmacol. 1989; 3:183-91.

Munno I, Chiechi LM, Lacedra G, Berardesca C, Patimo C, Marcuccio L, Nardelli P, Loizzi P. Evaluation of nonspecific immunity and plasma levels of interferon-gamma, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in preeclampsia. Immunopharmacol Immunotoxicol. 1999; 21:551-64.

Muzes G, Deak G, Lang L, Nekam K, Gergely P, Feher J. Effect of the bioflavonoid silymarin on the in vitro activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme. Acta Physiol Hung 1991; 78:3-9.

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

Nebot C, Moutet M, Huet P, Xu JZ, Yadan JC, Chaudiere J. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. Anal Biochem. 1993; 214:442-51.

Niho Y, Niiro H, Tanaka Y, Nakashima H, Otsuka T. Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. Acta Haematol. 1998; 99:165-70.

Oian P, Omsjo I, Maltau JM, Osterud B. Increased sensitivity to thromboplastin synthesis in blood monocytes from pre-eclamptic patients. Br J Obstet Gynaecol 1985; 92:511-17.

Orange S, Horvath J, Hennessy A. Preeclampsia is associated with a reduced interleukin-10 production from peripheral blood mononuclear cells. Hypertens Pregnancy. 2003; 22:1-8.

Paternoster DM, Fantinato S, Manganelli F et al. Recent progress in the therapeutic management of pre-eclampsia. Expert Opin Pharmacother 2004; 5:2233-9.

Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, Soares AM. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis.Microbes Infect. 2003; 5:413-8.

Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 2007; 57:177-85.

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

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

Polyak SJ, Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Liu Y, Lee DY. Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. Gastroenterology. 2007;132:1925-36.

Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian J Med Res. 2006; 124:491-504.

Redman CW, Saks GP, Sargent IL. Normal pregnancy stimulates a maternal inflammatory response which decompensate in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1999; 180:499-506.

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1999a ; 180:499-506.

Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. Placenta. 2000; 21: 597-602.

Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. Placenta 2003; 24: S21-S27.
Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Science. 2005; 308:1592-4.

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

Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin JN Jr, Bennett WA. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 1999; 181:915-20.

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

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

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

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

Rook GA, Tarvene J, Leveton C, Steele J. The role of gamma- interferon, vitamin D3 metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. Immunology 1987; 62:229-34.

Rusterholz C, Hahn S, Holzgreve W. Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. Semin Immunopathol 2007;29:151-62.

Sacks G, Sargent I, Redman C. An innate view of human pregnancy. Immunol Today. 1999; 20:114-8.

Sacks GP, Studena K, Sargent IL, Redman CWG. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. Am J Obstet Gynecol 1998; 179:80-86.

Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. Mol Aspects Med. 2007; 28:192-209.

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; 47:91-7.

Seki H, Matuoka K, Inooku H, Takeda S. TNF-alpha from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line. J Obstet Gynaecol Res. 2007; 33:408-16

Shanmugam K, Holmquist L, Steele M, Stuchbury G, Berbaum K, Schulz O, Benavente García O, Castillo J, Burnell J, Garcia Rivas V, Dobson G, Münch G. Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. Mol Nutr Food Res. 2008; 52:427-38

Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. Int J Gynaecol Obstet. 2006; 94:23-7.

Sharma A, Satyam A, Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. Am J Reprod Immunol. 2007; 58: 21-30.

Schümann J, Prockl J, Kiemer AK, Vollmar AM, Bang R, Tiegs G. Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. J Hepatol. 2003; 39:333-40.

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

Sikkema JM, van Rijn BB, Franx A, Bruinse HW, de Roos R, Stroes ES, van Faassen EE. Placental superoxide is increased in pre-eclampsia. Placenta. 2001; 22:304-8.

Sunder-Plassmann G, Derfler K, Wagner L, Stockenhuber F, Endler M, Nowotny C, Balcke P. Increased serum activity of interleukin-2 in patients with pre-eclampsia. Autoimmun. 1989; 2:203-5.

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: 49-55.

Teran E, Escudero C, Moya W, Flores M, Vallance P, Lopez-Jaramillo P Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with pre-eclampsia. Int J Gynaecol Obstet. 2001; 75:243-9.

Tsukimori K, Tsushima A, Fukushima K, Nakano H, Wake N. Neutrophil-derived reactive oxygen species can modulate neutrophil adhesion to endothelial cells in preeclampsia. Am J Hypertens. 2008; 21:587-91.

van Nieuwenhoven AL, 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. Hypertens Pregnancy. 2008; 27:207-24.

Varga Z, Czompa A, Kakuk G, Antus S. Inhibition of the superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignans. Phytother Res 2001; 15: 608-12.

Varga Z, Seres I, Nagy E, Ujhelyi L, Balla G, Balla J, Antus S. Structure prerequisite for antioxidant activity of silybin in different biochemical systems in vitro. Phytomedicine. 2006;13:85-93.

Valenzuela A, Garrido A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. Biol Res. 1994; 27:105-12.

Valenzuela A, Bustamante JC, Videla C, Guerra R. Effect of silybin dihemisuccinate on the ethanol metabolizing systems of the rat liver. Cell Biochem Funct. 1989; 7:173-8.

Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CWG. Interleukin-6, tumor necrosis factor and soluble tumor necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 1995; 102: 20-5.

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

Walsh SW. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. Semin Reprod Endocrinol. 1998;16:93-104.

Wang Y, Walsh SW. TNF-alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. J Reprod Immunol. 1996; 32:157-69.

Wang Y, Walsh SW. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. Placenta. 2001 Feb-Mar;22(2-3):206-12.

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

Wellington K, Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. Bio Drugs 2001; 15:465-89.

Wickens D, Wilkins MH, Luneye J, Ball G, Dormandy TL. Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. Ann Clin Biochem 1981; 18: 158-62.

Yao-Cheng R. Advances in pharmacological studies of silymarin. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86: 79-85.

Zielińska-Przyjemska M, Wiktorowicz K. An in vitro study of the protective effect of the flavonoid silydianin against reactive oxygen species. Phytother Res. 2006;20:115-9.

This document was created with Win2PDF available at http://www.win2pdf.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.