
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA**

**NÍVEIS DA QUIMIOCINAS RANTES NA PLACENTA, PLASMA MATERNO E
PLASMA DO CORDÃO UMBILICAL EM GESTANTES NORMAIS E COM
SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPسيا**

ILSON DIAS DA SILVEIRA

Porto Alegre, 2012

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA**

ILSON DIAS DA SILVEIRA

**NÍVEIS DA QUIMIOCINA RANTES NA PLACENTA, PLASMA
MATERNO E PLASMA DO CORDÃO UMBILICAL EM GESTANTES
NORMAIS E COM SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPZIA.**

**Porto Alegre
2012**

ILSON DIAS DA SILVEIRA

**NÍVEIS DA QUIMIOCININAS NA PLACENTA, PLASMA
MATERNO E PLASMA DO CORDÃO UMBILICAL DE GESTANTES
NORMAIS E COM SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPسيا**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul para obtenção do Título de Doutor em Medicina e Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Bartira Ercilia Pinheiro da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Porto Alegre
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S587n Silveira, Ilson Dias da

Níveis da quimiocina RANTES na placenta, plasma materno e plasma do cordão umbilical em gestantes normais e com síndrome de pré-eclâmpsia. / Ilson Dias da Silveira. - Porto Alegre: PUCRS, 2012.

111 f.: il. gráf tab. Inclui um artigo científico para submissão à publicação.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bartira Ercília Pinheiro da Costa.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Nefrologia.

1. PLACENTA/irrigação sanguínea. 2. PLASMA/imunologia. 3. QUIMIOCINAS/sangue. 4. CITOCINAS/análise. 5. GRAVIDEZ/imunologia. 6. PRÉ-ECLÂMPsia/imunologia. 7. CORDÃO UMBILICAL/irrigação sanguínea. 8. MARCADORES BIOLÓGICOS/sangue. 9. ESTUDOS TRANSVERSAIS. 10. ESTUDOS OBSERVACIONAIS. I. Costa, Bartira Ercília Pinheiro da. II. Poli de Figueiredo, Carlos Eduardo. III. Título.

C.D.D. 618.9201

N.L.M. QY 335

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia

Bibliotecária CRB 10/196

Dedicatória

*Aos meus filhos Mariana e Gabriel, para estimular a busca incessante do conhecimento e da
liberdade;*

À Noara, pelo sentimento que este resgate despertou em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ilson e Ide (in memorian), pela educação e exemplo de vida que me proporcionaram;

Ao meu sócio Porciuncula, pelo apoio e sacrifício nos momentos em que estive ausente;

Aos meus orientadores Doutores Bartira e Poli, pela confiança em receber um desconhecido do outro lado do Estado, pela compreensão e orientação nos momentos difíceis e, principalmente, pelo carinho que recebi de ambos nesta trajetória;

À Bruna e Marta, pela amizade e contribuição nas dosagens realizadas no laboratório de Nefrologia do IPB/HSL da PUCRS.

"Aqui estão os loucos. Os desajustados. Os rebeldes. Os encenqueiros. Os que fogem ao padrão. Aqueles que vêem as coisas de um jeito diferente. Eles não se adaptam às regras e nem respeitam o status quo. Você pode citá-los ou achá-los desagradáveis, glorificá-los ou desprezá-los. Mas a única coisa que você não pode fazer é ignorá-los. Porque eles mudam as coisas. Eles empurram adiante a raça humana. E enquanto alguns os vêem como loucos, nós os vemos como gênios. Porque as pessoas que são loucas o bastante para pensarem que podem mudar o mundo, são as únicas que realmente podem fazê-lo."

Jack Kerouac

RESUMO

OBJETIVO: O objetivo deste trabalho foi estimar os níveis de RANTES na placenta e nos plasmas materno e do cordão umbilical na síndrome de pré-eclâmpsia e gestação normal.

MÉTODOS: Estudo transversal e observacional estimou os níveis de RANTES na placenta e nos plasmas materno e do cordão umbilical na síndrome de pré-eclâmpsia (n=33) comparando com um grupo controle de gestantes normais (n=36) atendidas no Hospital São Lucas/PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil. As concentrações de RANTES foram verificadas através do método de enzima imuno ensaio (ELISA) específico para humanos.

RESULTADOS: Mulheres com síndrome de pré-eclâmpsia apresentaram níveis significativamente maiores de RANTES no plasma e placenta quando comparadas a gestantes normais ($P < 0,01$). O plasma do cordão umbilical de recém-nascidos de gestantes com pré-eclâmpsia mostraram níveis de RANTES significativamente menores que o plasma do cordão umbilical de recém-nascidos de gestantes normais ($P < 0,01$). A concentração de RANTES placentário correlacionou-se positivamente com a concentração de RANTES no plasma materno ($r = 0,697$; $P < 0,001$) e negativamente com o plasma do cordão umbilical ($r = - 0,818$; $P < 0,001$). Forte correlação negativa na concentração de RANTES foi demonstrada entre plasma materno e plasma do cordão umbilical ($r = - 0,751$; $P < 0,001$).

CONCLUSÃO: Este estudo mostra uma resposta inflamatória distinta entre a mãe e o recém-nascido em ambas as condições, gestação normal e síndrome de pré-eclâmpsia. A placenta e o plasma materno demonstraram uma concentração da citocina inflamatória RANTES aumentada na síndrome de pré-eclâmpsia, entretanto, no plasma do cordão umbilical dos recém-nascidos dessas gestantes estava reduzida, sugerindo uma resposta fetal anti-inflamatória.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To estimate RANTES levels at maternal plasma, umbilical cord blood plasma and placenta in preeclampsia syndrome and normal pregnancy.

METHODS: A cross-sectional study was conducted to estimate RANTES levels in maternal plasma, placenta and cord blood plasma in preeclampsia syndrome (n=33) compared to a control group of women with normal pregnancy (n=36) attended at São Lucas Hospital/PUCRS, Porto Alegre, RS Brazil. Concentrations of RANTES were measured using a human RANTES ELISA assay.

RESULTS: Women with preeclampsia syndrome showed significantly higher RANTES levels in plasma and placenta in comparison to women with normal pregnancy ($P<0.01$). The cord blood plasma of infants born from women with preeclampsia syndrome had a significantly decreased RANTES levels compared to infants born from a normal pregnancy ($P<0.01$). The concentration of placental RANTES was positively correlated with RANTES in the maternal plasma (Pearson's correlation $r= 0.697$; $p<0.001$), and negatively with the cord blood plasma ($r= -0.818$; $p<0.001$). A strong negative correlation was also demonstrated between maternal plasma and cord blood plasma RANTES ($r= -0.751$, $p<0.001$).

CONCLUSION: This study shows a distinct inflammatory response between mother and new born in preeclampsia syndrome and normal pregnancy. In preeclampsia syndrome maternal plasma and placenta displayed increased pro-inflammatory RANTES cytokine concentration, however a reduced levels were detected in the umbilical cord plasma from women with preeclampsia syndrome, suggesting a fetal anti-inflammatory response.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos dos recém-nascidos e das gestantes.	56
Tabela 2 - Correlação de RANTES entre plasma materno, plasma do cordão umbilical e placenta.	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protótipos Estruturais de Quimiocinas α e β Adaptado de Adams & Lloyd (1997).	33
Figura 2 - Influência da concentração de RANTES na ligação celular.	37
Figura 3 - Etapas da metodologia de ELISA por captura (sanduíche)..	52
Figura 4 - Níveis de RANTES no plasma do cordão umbilical, plasma materno e placenta.	57
Figura 5 - Correlação entre níveis de RANTES na placenta e idade gestacional obstétrica.	58
Figura 6 - Correlação entre níveis de RANTES no plasma do cordão umbilical e idade gestacional obstétrica.	59
Figura 7 - Correlação entre níveis de RANTES no plasma materno e idade gestacional obstétrica.	60
Figura 8 - RANTES no plasma materno conforme classificação do IMC das gestantes.	62
Figura 9 - RANTES no tecido placentário conforme classificação do IMC das gestantes. Gestantes.	63
Figura 10 - RANTES no plasma do cordão umbilical conforme classificação do IMC das gestantes..	64

LISTA DE ABREVIATURAS

CD 4	Linfócito T Auxiliar CD 4
CD 8	Linfócito T Citotóxico CD 8
CD 45RO	Linfócitos de Memória CD45RO
G-CFS	Fator Estimulante de Colonização Granulocítica
GM-CFS	Fator Estimulante de Colonização Monocítica-Granulocítica
ICAM-1	Molécula de Adesão Intracelular
IFN-γ	Interferon Gama
IL- 4	Interleucina 4
IL- 5	Interleucina 5
IL- 6	Interleucina 6
IL- 8	Interleucina 8
IL- 9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL- 16	Interleucina 16
IL-1α	Interleucina 1 Alfa
IL-1β	Interleucina 1 Beta
MCP-1	Proteína Quimioatratante de Monócitos 1
MIP-1	Proteína Inflamatória Macrofágica-1
NK	Células Natural Killer
PCR	Proteína C Reativa
PE	Pré-eclâmpsia
PIGF	Fator de Crescimento Placentário

RANTES	Regulado, Expressado e Secretado sob Ativação de Célula T Normal (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted)
RN	Recém-nascido
sEng	Endoglina solúvel
s-Flt-1	Fator solúvel tipo Tirocinaquinase 1
sIL-4r	Receptor Solúvel de Interleucina 4
SPE	Síndrome de Pré-eclâmpsia
TGF-β	Fator de Crescimento Tecidual Beta
Th	Linfócitos T Helper
Th1	Linfócitos T Helper 1
Th2	Linfócitos T Helper 2
Th3	Linfócitos T Helper 3
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VCAM-1	Molécula de Adesão da Célula Vascular
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VEGF1-R	Receptor do Fator de crescimento Endotelial 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 PRÉ-ECLÂMPسيا	14
1.2 CITOCINAS NA PRÉ-ECLÂMPسيا	20
1.2.1 Fator de Necrose Tumoral	23
1.2.2 Interferon.....	26
1.2.3 Interleucina 1	27
1.2.4 Interleucina 6.....	28
1.2.5 Interleucina 8.....	29
1.2.6 Interleucina 15	29
1.2.7 Interleucina 16	30
1.2.8 Fator Solúvel Tipo Tirosinaquinase-1	30
1.3 RANTES (CCL5)	31
2 HIPÓTESE	47
3 OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GERAL:	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 DELINEAMENTO	49
4.2 CRITÉRIOS	49
4.3 APROVAÇÕES DO ESTUDO	50
4.4 COLETAS	50
4.5 ENSAIOS	51
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4.7 FOMENTO	54
5 RESULTADOS	55
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO.....	71
8 REFERÊNCIAS.....	72

ANEXOS	86
ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.	87
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	88
ANEXO 3 - PROTOCOLO DE ENSAIO DE RANTES	90
ANEXO 4 - PROTOCOLO DE COLETA PADRONIZADO	91
ANEXO 5 - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	92
ANEXO 6 - ARTIGO	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPSIA

Pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez humana, que ocorre após a 20^a semana de gestação e é caracterizada por hipertensão arterial sistêmica e proteinúria patológica. A hipertensão é definida como pressão sistólica acima de 139 mmHg e diastólica acima de 89 mmHg em gestante previamente normotensa. A proteinúria é considerada patológica quando ultrapassar 300 mg em urina de 24 horas (Gifford et al, 2000; ACOG Practice Bulletin Nº 33, 2002). Manifestações clínicas secundárias incluem edema, cefaleia, distúrbios visuais, dor em quadrante superior direito, dor epigástrica, náusea e vômito (Gifford et al, 2000). A PE é uma patologia multissistêmica que pode causar descolamento prematuro de placenta, coagulação intravascular disseminada, hemorragia cerebral, falência hepática, edema agudo de pulmão, insuficiência renal aguda e hemólise na gestante (Friedman, 1995). No feto, compreende condições intrauterinas desfavoráveis e alterações de fluxo placentário, as quais acarretam transtornos como: crescimento intrauterino restrito, hipóxia fetal e prematuridade (Friedman, 1995). Sabe-se que a perda de fluxo sanguíneo para o conceito leva a uma redistribuição da circulação fetal, privilegiando os órgãos mais nobres em detrimento da periferia do organismo. Estes fatos estão associados aos riscos de morbimortalidade do recém-nascido (Friedman, 1995), que acabam por onerar o sistema público de saúde.

A classificação de PE entre as patologias hipertensivas da gestação não é homogênea. Diversos grupos de especialistas publicaram consensos para, entre outros objetivos, estabelecer a nomenclatura e a diferenciação entre hipertensão crônica, hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia/eclâmpsia e pré-eclâmpsia sobreposta em hipertensão crônica (Akinkugbe et al, 1987; Davey e MacGillivray, 1988; Helewa et al, 1997; Brown et al, 2000; Sociedades Brasileiras de Hipertensão, Cardiologia e Nefrologia, 2010; World Health Organization, 2011; ACOG, Practice Bulletin N° 125, 2012). A divergência conceitual e classificatória sobre as síndromes gestacionais hipertensivas e, em especial, sobre a definição de pré-eclâmpsia/síndrome de pré-eclâmpsia, implica em diferenças que são abordadas no artigo de Harlow e Brown, (2001) e em nosso meio por Comparsi e colaboradores (2001).

O estudo e entendimento da Síndrome de Pré-eclâmpsia (SPE), no presente ganhou maior relevância pela Declaração do Milênio editada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Na meta número cinco (5) do referido documento, é proposta uma redução de 75 % na taxa de mortalidade materna mundial entre 1990 e 2015 (United Nations General Assembly, 2000). Apesar do reconhecimento internacional do desempenho apresentado pelo Brasil na redução da taxa de mortalidade materna nos últimos anos, na América Latina e no Caribe, a doença hipertensiva representa a maior causa de morte materna com 25,7% dos casos, sendo a morbimortalidade para a mulher e seus filhos associada com PE e suas complicações, um fator importante nestes dados epidemiológicos. Este panorama é extensivo a países subdesenvolvidos (Khan et al, 2006; Duley, 2009; Hogan et al, 2010). De fato, a PE é um dos principais motivos de morbimortalidade materna e fetal, sendo 10-15% das mortes maternas no mundo diretamente associadas a esta

patologia e a seu agravamento clínico para eclâmpsia (Khan, 2006; Duley, 2009). No Brasil, a PE/eclâmpsia afeta 2,3 % das gestações, sendo três vezes maior a incidência em mulheres nulíparas (Gaio et al, 2001).

Os fatores de risco clássicos para PE tais como: nuliparidade, resistência à insulina, história prévia de PE, história familiar de PE, hiperhomocisteinemia, diabetes gestacional, hipertensão crônica, obesidade, extremos de idade reprodutiva, gestação múltipla, infecções maternas, anomalias congênitas e cromossômicas, mola hidatiforme, doenças renais, trofoblastias e doenças reumatológicas auto-imunes, como lúpus eritematoso sistêmico e síndrome anti-fosfolipídica estão documentados (Odegard et al, 2000; Sibai et al, 2005). Fatores de risco relacionados à paternidade e à inseminação artificial também têm sido estudados (Einarsson et al, 2003; Dekker e Robillard, 2003). O aumento do índice de massa corpórea (IMC) pré-concepcional ou como parte da síndrome da resistência à insulina é um importante fator de risco para a PE. Em qualquer destas situações, há aumento dos marcadores de inflamação como Proteína C Reativa (PCR), citocinas como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-8 (IL-8) (O'Brien et al, 2003; Walsh, 2007). Em uma coorte estudada por Mostello e colaboradores (2008) foi demonstrado que o aumento de IMC durante a gestação eleva o risco de recorrência de PE em mulheres com história prévia.

Há várias teorias que tentam explicar os mecanismos etiológicos e/ou fisiopatológicos da PE, sendo a isquemia placentária, estresse oxidativo, disfunção endotelial, resposta imune e pré-disposição hereditária as mais aceitas atualmente (Roberts et al, 1989; Dekker e Sibai, 1998; Redman et al, 1999; Xia e Kellems, 2009; Sharma et al, 2010). A teoria da disfunção endotelial materna, possivelmente relacionada a fatores circulantes elaborados pela placenta anormal, quando testada,

tem mostrado fortes evidências no estabelecimento e desenvolvimento desta síndrome (Roberts, 1989; Dekker e Sibai, 1998; Mutter e Karumanchi, 2008). A célula endotelial é importante na captação de células imunes devido a sua posição de interface entre células circulantes e o processo patológico, além de expressar moléculas de adesão. Essas células também contribuem para o acúmulo focal de células imunes por produzirem citocinas que podem ativar integrinas expressadas por células circulantes e, subsequentemente, promover a migração de tais células através da parede vascular em um processo chamado de haptotaxia (Springer, 1994).

Na SPE há evidências de lesão endotelial renal ou endoteliose glomerular, a qual está associada à proteinúria, que somada à hipertensão arterial, a qual é secundária à disfunção endotelial difusa, estabelecem os critérios diagnósticos desta síndrome (Roberts et al, 1989; Gaber et al, 1994). A endoteliose glomerular configura-se pelo aumento do volume da célula endotelial e a vacuolização do citoplasma, assim como a presença de depósitos fibrinóides sub-endoteliais foram tidos no passado como patognomônicos da pré-eclâmpsia (Kincaid-Smith, 1991). De fato, a endoteliose glomerular pode estar presente na gestação normal, sendo considerada uma manifestação característica na hipertensão gestacional e na PE (Strevens et al, 2003). A função endotelial vascular desordenada parece ser uma condição importante na hipertensão gestacional, pois a mulher com PE demonstra tono simpático aumentado (Schobel et al, 1996), resposta pressora aumentada para noradrenalina (Chesley, 1965), maior sensibilidade para angiotensina II (Gant et al, 1973), além de diminuída concentração endotelial de vasodilatadores como prostaglandina I₂ (Baker et al, 1996) e óxido nítrico (Williams et al, 1997).

As várias teorias publicadas sobre PE apresentam fundamentação (Dekker e Sibai, 1998; Mutter e Karumanchi, 2008; Xia e Kellems, 2009) difícil de serem

refutadas; no presente estudo foi estabelecida uma opção pela teoria inflamatória, onde a disfunção endotelial e a ativação leucocitária são condições fundamentais encontradas durante a fisiopatologia desta síndrome (Roberts et al, 1989; Redman et al, 1999; Borzychowski et al, 2006; Redman e Sargent, 2009; Redman, 2011).

Assim, merece importância a ideia de PE como sendo “uma resposta inflamatória materna excessiva à gravidez” preconizada por Redman e colaboradores em 1999. No referido trabalho os autores evidenciam que a resposta inflamatória está bem desenvolvida na gravidez e, principalmente, as diferenças quanto à atividade inflamatória entre gravidez normal e PE sendo menos contundentes que àquelas entre a gestação normal e mulheres sem gestação, concluindo que PE é estabelecida quando uma resposta inflamatória materna universal à gravidez descompensa em casos isolados, podendo ocorrer devido ao estímulo ou a resposta materna serem muito intensos (Redman et al, 1999). A placenta tem sido aceita como geradora dos estímulos à fisiopatologia da PE. De fato, em ambas as fases descritas e aceitas da PE (Redman, 1991; Redman e Sargent, 2009; Wikström et al, 2007; Redman, 2011) a placenta produz e libera na interface materno-fetal moléculas citotóxicas em resposta a uma injúria ou agressão sofrida por vias distintas, as quais vão definir as duas fases estabelecidas da PE: primária ou precoce e a secundária ou tardia.

Tem sido proposto que na fase primária da PE a hipóxia placentária (agente agressor placentário) estimula a liberação de fatores citotóxicos na interface materno-fetal para a circulação, manifestando os sintomas maternos associados à PE (Sharma et al, 2010). PE precoce parece ocorrer pela placentação pobre, primeiro estágio da síndrome que ocorre na primeira metade da gravidez quando ainda não há sintomas clínicos desta patologia. Este fato acarretaria na formação de

uma placenta menor e conseqüente restrição de crescimento fetal (Redman e Sargent, 2009; Redman, 2011).

Tem sido sugerido também que o papel do Fator de Necrose Tumoral (TNF) em níveis fisiológicos limita a invasão trofoblástica (Haider e Knöfler, 2009). Neste caso, o citotrofoblasto penetraria apenas os segmentos deciduais mais superficiais das artérias espiraladas uterinas falhando na devida mimetização destas artérias, deixando estreitos e musculares os segmentos mais profundos, por conseguinte insuficientes para aumento do fluxo sanguíneo. Na camada média do vaso, ocorreria aterosose aguda e necrose fibrinóide, na íntima surgiriam fibrina, macrófagos com lipídios e células musculares lisas (Dekker e Sibai, 1998; Steegers et al, 2010). A adequada mimetização das artérias espiraladas ocorre fisiologicamente no útero criando um sistema arteriolar de baixa resistência e ausência do controle vasomotor materno, permitindo aumento do suprimento sanguíneo para o feto, durante o primeiro e início do segundo trimestres da gestação (Pijnenborg, 1996; Brosens et al, 1977).

Na fase secundária ou tardia com a síndrome clínica já estabelecida, associam-se fatores liberados pelo estresse oxidativo placentário, com placentas de tamanho normal e peso normal dos RN, sendo o agente agressor os radicais livres, sobretudo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, gerados por ativação leucocitária e processos inflamatórios de doenças crônicas como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, obesidade e síndrome metabólica, dentre outras (Borzychowski et al, 2006; Redman e Sargent, 2009; Redman, 2011). Embora a placenta estabeleça um papel central nesta síndrome (Friedman et al, 1995; Dekker e Sibai, 1998; Redman et al, 1999; Mutter e Karumanchi, 2008), a etiologia da PE ainda é desconhecida. Levando em conta que a retirada da placenta cura a gestante

(Chesley, 1980), alguns autores consideram-na como responsável pelo aparecimento da síndrome.

Está bem estabelecido que a hipóxia e o estresse oxidativo placentário aumentam a expressão e a liberação na placenta de estímulos inflamatórios, ou seja, há liberação de moléculas citotóxicas e anti-angiogênicas como o Fator Solúvel Tipo Tirosinaquinase (sFlt-1); inflamatórias como as citocinas TNF- α , Interleucina-1 α (IL-1 α), Interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, Interleucina-15 (IL-15) e Interleucina 16 (IL-16) (Redman et al, 1999; Jonsson et al, 2006; Hu et al, 2007; Xia e Kellems, 2009; Sharma et al, 2010) .

1.2 CITOCINAS NA PE

Citocinas, quimiocinas e fatores biológicos são moléculas proteicas secretadas por células do sistema imunológico durante uma resposta imune ou como meio de comunicação (Stow et al, 2009). Estas moléculas podem induzir ativação, diferenciação, crescimento e maturação celular, regulando e determinando a natureza da resposta imune (Mossman et al, 1986; Boris e Steinke, 2003; Jonsson et al, 2006). Toda a célula possui via secretória, sendo as duas principais categorias de vias exocíticas aquelas liberadas por grânulos secretórios, enquanto em outras células são liberadas por vias secretórias constitutivas que, ao contrário, possuem mais transportadores vesiculares dinâmicos (Stow et al, 2009). Os passos iniciais das vias secretórias são comuns a todas células eucarióticas. As vias secretórias constitutivas resultam em liberação contínua de pequena quantidade de citocinas, entretanto, em algumas células como macrófagos ativados, as moléculas e os transportadores desta via secretória podem ser supra regulados para aumentar

o tráfico, liberando mais citocinas em resposta à ativação celular a um insulto imune, gerando diferentes tipos de resposta imune como citotóxica, humoral, mediada por célula ou alérgica (Mossmann et al, 1986; Carter, 1997; Borish e Steinke, 2003; Bard e Malhotra, 2006; Lieu et al, 2008; Stow et al, 2009).

Em 1986, dois tipos de células T-helper (Th) foram descritos (Mossmann et al, 1986). Linfócitos Th1 são caracterizados por sua produção de Interferon gama (IF- γ) e contribuem primariamente para a imunidade celular. Linfócitos Th2 (Th2), por sua vez, são caracterizados pela produção de Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL-5), Interleucina-9 (IL-9) e Interleucina-13 (IL-13). IL-4 é a maior determinante na diferenciação linfocítica Th2 (Borish e Steinke, 2003). Borish e Steinke (2003) acrescentaram a classificação de linfócitos Th3, os quais possuem tendências imunossupressoras e são caracterizados pela sua produção de Interleucina-10 (IL-10) e Fator de Crescimento e Diferenciação Beta (TGF- β). Linfócitos Th1 estimulam células T e monócitos com recrutamento e ativação de fagócitos mononucleares e estão associados com a imunidade celular mediada por anticorpos e atividade inflamatória. Já as células Th2 promovem a estimulação do sistema imunológico humoral através da proliferação de células B (Carter, 1997). A expressão maior dos linfócitos Th2 em relação aos Th1 tem sido associada a gestações bem sucedidas (Dekker e Sibai, 1998).

A PE tem sido associada a uma manifestação Th1 e diminuição da atividade Th2 durante o período gestacional (Jonsson et al; 2006; Hu et al, 2007). A citocina mais importante na imunidade mediada por célula é o IF- γ , produzido primeiramente por células T, células Natural Killer (NK) e em menor grau por macrófagos (Farrar e Schreiber, 1993; Boris e Steinke, 2003). Wikström e colaboradores (2007) estabeleceram diferenças entre PE precoce e tardia através da análise do perfil das

moléculas angiogênicas Fator de Crescimento Placentário (PIGF) e Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) que estão diminuídas e anti-angiogênica sFlt-1 que está aumentada na PE. Estas alterações estão presentes, sobretudo na PE precoce, na qual a hipóxia placentária parece ser um componente importante na liberação desta molécula anti-angiogênica que está relacionada às manifestações clínicas da síndrome como disfunção endotelial, hipertensão e proteinúria (Wikström et al, 2007; Sharma et al, 2010).

A severidade da PE tem sido correlacionada com a produção aumentada de sFlt-1 e endoglina solúvel (sEng) e à diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10, promovidas pela hipóxia placentária propiciando um desequilíbrio no sistema imune (Sharma et al, 2010). A diminuição de IL-10 na PE está associada à inibição da atividade imune Th2 (Sharma et al, 2010).

A PCR, outro importante marcador inflamatório, está também aumentada na PE, sobretudo na precoce (Wikström, 2007), sendo a IL-6 considerada o maior indutor da síntese hepática de proteínas de fase aguda (Borish e Steinke, 2003). A IL-16 estimula a produção de citocinas pro-inflamatórias IL-6, TNF- α , IL-1 α e IL-15 pelos monócitos (Mathy et al, 2000) e inibe a liberação de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e Interleucina-5 (IL-5) contribuindo, desta forma, para uma diminuição da imunidade Th2 (Pinsonneault et al, 2001; Hu et al, 2007; Sharma et al, 2010).

O estudo de Jonsson e colaboradores (2006) apoia a hipótese da manifestação do sistema imune Th1 na PE, pois seus resultados ilustraram níveis séricos maternos aumentados das citocinas pró-inflamatórias Th1 IL-6 e IL-8, além do aumento surpreendente do receptor solúvel de Interleucina-4 (sIL-4r) que é especulado pelo autor como diminuição da atividade Th2 devido à provável diminuição de IL-4 na PE. Benyo e colaboradores (2001) mostraram que a

incubação de placenta humana em condição reduzida de oxigenação (hipóxia) resultou na produção placentária aumentada de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β . Vários trabalhos têm sido publicados investigando citocinas inflamatórias na PE: TNF- α , IL1- α , IL1- β , IL-6, IL-8, IL-15 e IL-16 (Dekker e Sibai, 1998; Redman et al, 1999; Benyo et al, 2001; Jonsson et al, 2006; Mutter e Karumanchi, 2008). No cordão umbilical, parece predominar a expressão de citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8, sobretudo na corioamionite histológica associada com aumento marcante de TNF- α , IL1- β , IL-6, IF- γ , IL-10, Fator Estimulante de Colonização Granulocítica (G-CSF), IL-8 e Proteína Quimioatraente de Monócitos-1 (MCP-1) (Hariharan et al, 2000; Takahashi et al, 2010).

A seguir, serão abordadas algumas das principais citocinas alteradas na PE avaliando seu comportamento de acordo com um desequilíbrio no sistema imunológico Th1/Th2.

1.2.1 Fator de Necrose Tumoral

Fator de Necrose Tumoral (TNF), também chamado de caquexina ou caquetina, foi inicialmente isolado por Craswell e colaboradores em 1975 que tentou identificar os fatores citotóxicos responsáveis pela necrose do Sarcoma de Meth. Em condições fisiológicas, TNF está envolvido com a manutenção e a defesa na homeostasia celular, proteção contra certos insultos neurológicos, assim como no controle da proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência celular (Haider e Knöfler, 2009). Baixas concentrações por um período longo desta citocina estão sempre associadas à caquexia, isto é, fraqueza, perda de peso e atrofia muscular,

dados comumente encontrados em pacientes com tumores (Beutler et al, 1985). TNF representa duas proteínas homólogas derivadas primariamente de fagócitos mononucleares (TNF- α) e linfócitos (TNF- β) (Beutler and Cerami, 1989). TNF- α é predominantemente produzida sob ativação de células mielóides e além dos macrófagos, pode ser também produzida por neutrófilos, linfócitos ativados, células Natural Killer (NK), endoteliais, mamárias, fibroblastos e tecido neuronal (Borish e Steinke, 2003; Haider e Knöfler, 2009).

TNF interage com células endoteliais para iniciar a produção de moléculas de adesão celular, conhecidas como Molécula de Adesão Intracelular (ICAM-1), Molécula de Adesão da Célula Vascular (VCAM-1) e seletina-E. TNF é um potente ativador leucocitário de neutrófilos, mediando a aderência, quimiotaxia, degranulação e queima respiratória (Beutler e Cerami, 1989). A abundância de TNF e seus receptores solúveis de membrana em tecidos distintos como endométrio, decídua e placenta sugere uma atuação desta citocina nos tecidos reprodutivos (Haider e Knöfler, 2009). Respostas exacerbadas de TNF estão associadas a doenças reprodutivas, como menorragia, infecções amnióticas, crescimento intrauterino restrito, prematuridade, abortos espontâneos recorrentes, PE e endometriose (Haider e Knöfler, 2009). Na placenta, TNF pode inibir a fusão celular trofoblástica e a produção hormonal, provocar aumento de apoptose e produção de citocinas inflamatórias, prostaglandinas e cortisol (Haider e Knöfler, 2009).

Um marcador da superfamília dos receptores de TNF (TNFR) são as regiões ricas em cisteína em seus domínios extracelulares incluindo seis resíduos altamente conservados, tendo cada receptor TNFR1 e TNFR2, quatro repetições de cisteína (Smith et al, 1994). Ativação do TNFR1 leva à via inflamatória, assim como à morte celular programada, ambas associadas à injúria tecidual. Sinalização através do

TNFR2 pode induzir apoptose, mas também contribui para sobrevivência celular através da reparação tecidual e angiogênese (Bradley, 2008). O complexo I da TNFR1 é capaz de ativar a NF κ B, a qual é descrita como um fator de transcrição regulador chave na regulação de numerosos processos como desenvolvimento, inflamação, oncogênese ou estresse celular (Devin et al, 2001). A segunda sinalização do TNFR1 é a via de morte celular através da ativação da caspase 8 e em passo subsequente à caspase 3, iniciando a apoptose (Wang et al, 2008). TNFR2 não possui o domínio da morte celular, mas pode promover proliferação ou apoptose, ativa a via PI3K-Akt através do VEGF modulando finalmente a adesão, proliferação, migração e sobrevivência celular (Zhang et al, 2003).

O mRNA e a proteína TNF são expressos em várias células no endométrio como fibroblastos, macrófagos, células epiteliais granulares e células vasculares e também nas células musculares lisas miométrais. Assim como o mRNA do receptor de TNF, TNFR1 é expresso pela placenta, principalmente através das células trofoblásticas colunares similarmente ao TNFR2 (Yang et al, 1993; Yelavarthi e Hunt, 1993). Durante o primeiro trimestre da gestação, o TNF mRNA é expresso em todos os tipos de células da linhagem trofoblástica, ganhando intensidade na invasão trofoblástica nas células endoteliais das artérias espiraladas durante a placentação (Pijnenborg, 1996).

Células NK uterinas são relevantes para o processo de implantação embrionário na decídua uterina no início da gestação e juntamente com linfócitos T CD 8 e macrófagos CD 68 mostram uma forte associação com células trofoblásticas (King et al, 1997; Scaife et al, 2006). Células NK uterinas podem estar envolvidas na pobre placentação, pois quando ativadas por IL-2, IL-12 e IL-15 tornam-se ativadas promovendo ação citotóxica e apoptótica em trofoblastos através da liberação de

grande quantidade de TNF- α , Fator Estimulante de Colonização Monocítica-Granulocítica (GM-CSF), IL-1, Proteína Inflamatória Macrofágica Alfa (MIP-1 α), MIP-1 β) IFN- γ e RANTES (Starkey et al, 1993; King et al, 1997; Scaife et al, 2007). Aumento de TNF- α têm sido bem documentado na PE, pois há publicações mostrando aumento em plasma materno e líquido amniótico em PE severa, associando esta citocina com RN pequenos para idade gestacional (Kupferminc et al, 1994; Meekins et al, 1994; Schiff et al, 1994).

1.2.2 Interferon

Há três membros da família IFN (α , β e γ) e sua nomenclatura está baseada na capacidade de “interferir” no crescimento viral. IFN- γ é produzido primeiramente por linfócitos Th citotóxicos e células NK e em menor grau por macrófagos teciduais desencadeando a apresentação de antígeno e a produção de citocinas pelos monócitos, estimulando também a ativação através da aderência, fagocitose, secreção, queima respiratória e produção de óxido nítrico (Farrar e Schreiber, 1993). IFN- γ é a mais importante citocina envolvida na imunidade celular e possui modesta atividade antiviral (Farrar e Schreiber, 1993; Borish e Steinke, 2003). IFN- γ estimula a aderência de granulócitos nas células endoteliais através da indução do ICAM-1, uma atividade compartilhada com IL-1 e TNF. IFN- γ inibe efeitos mediados pela IL-4, contribuindo para diminuição da atividade imune Th2 (Borish e Steinke, 2003). Células NK ativadas secretam grandes quantidades de IFN- γ , o qual poderá estar envolvido na pobre placentação, pois esta citocina Th1 parece inibir a invasão trofoblástica no primeiro trimestre de gestação (Otun et al, 2003; Terme et al, 2005).

1.2.3 Interleucina 1

A família IL-1 é representada por 4 peptídeos, dos quais IL-1 α e IL-1 β , ambos com a mesma atividade biológica, estão envolvidos na PE (Dinarello e Wolff, 1993). IL-1 α é produzida pelas células apresentadoras de antígeno da linhagem monocítica, induzindo linfócitos T, já a IL-1 β é produzida pela linhagem linfocítica. A produção primária de IL-1 é realizada por células da linhagem fagocítica mononuclear (monócitos), sendo também produzida por outras células, como: endoteliais, queratinócitos, células sinoviais, osteoblastos, neutrófilos, células gliais e outras produtoras da enzima conversora de IL-1 ou também chamada de caspase (Cerretti et al, 1992). Os receptores Tipo I são responsáveis pela transdução dos efeitos biológicos atribuídos à IL-1 (Sims et al, 1993), os quais são efeitos pró-inflamatórios: ativação leucocitária de Linfócito T; aumento na liberação de IL-2, aumento na expressão de receptor de IL-2, aumento de proliferação de células B e aumento da síntese de imunoglobulinas. A produção de IL-1 durante a resposta imune produz alterações associadas ao estado patológico, interagindo com o sistema nervoso central para produzir febre, letargia, sono e anorexia. IL-1 promove também a síntese hepática de proteínas inflamatórias de fase aguda, além de estimular a aderência endotélio-celular de leucócitos através de supraregulação do ICAM-1, VCAM-1 e seletina. A referida interleucina contribui ainda para a hipotensão do choque séptico. Compartilha as mesmas propriedades biológicas do TNF (Borish e Steinke, 2003).

A IL-1 β está aumentada no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e a atividade quimiotóxica desta molécula, sobretudo em monócitos, conforme Chun-Li e colaboradores (2009) deve-se ao aumento da expressão e da atividade de quimiotaxia da quimiocina, Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES) (Chun-Li F, 2009). A produção de IL-1 β no cordão umbilical possui altos índices de correlação positiva com TNF- α , IFN- γ e GM-CSF (Takahashi et al, 2010). Além disso, células embrionárias mesênquimais do cordão umbilical sob ação da IL-1 β inicialmente aumentam a liberação de IL-6 até atingir um platô na curva dose-resposta, decaindo logo após, mesmo com uso contínuo de IL-1 β no meio de cultura celular (Liu e Hwang, 2005). Entretanto, foi verificado que os níveis de Leptina aumentaram continuamente após 17 dias de tratamento com IL-1 β , o que explica a diferenciação celular com expressão fenotípica de maturação lipogênica (Liu e Hwang, 2005).

1.2.4 Interleucina 6

A célula fagocítica mononuclear é a maior fonte de IL-6, podendo ser também produzida por linfócitos T e B, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e medula óssea, compartilhando várias atividades biológicas com a IL-1, como piroxia e síntese de proteínas inflamatórias, sendo considerada a IL-6 a mais importante indutora da síntese hepática de PCR (Borish e Steinke, 2003). Takahashi e colaboradores (2010) verificaram um alto coeficiente de correlação entre IL-6 e demais citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-1 β , IL-8 e TNF- α) no cordão umbilical. Além disso, a IL-6 no cordão umbilical foi associada a certas doenças em RN prematuros (Takahashi et al, 2010). O aumento de IL-6 no sangue

de pacientes com PE está bem documentado, contribuindo para a hipótese inflamatória e estabelecimento de um perfil Th1 nesta síndrome (Vince et al, 1995; Jonsson et al, 2006). Os aumentos de IL-6 e IL-8 no cordão umbilical durante o trabalho de parto estão associados à hipóxia (Jokic et al., 2000). Malamitsi-Puchner e colaboradores (2005) descreveram a influência do modo de nascimento nos níveis de citocinas circulantes no período perinatal, relatando a diminuição altamente significativa de IL-6 no cordão umbilical de RN nascidos de cesarianas comparados aos RN nascidos de parto normal..

1.2.5 Interleucina 8

As distinções estruturais entre as quimiocinas α e β são importantes porque estão associadas à capacidade de atuar sobre subtipos específicos de leucócitos, sendo a IL-8 um protótipo de citocinas do tipo α , as quais atuam predominantemente em neutrófilos, embora tenha ação de quimiotaxia em linfócitos T, basófilos e células NK (Adams e Lloyd, 1997). A IL-8 induz a adesão neutrofílica e a migração transendotelial, liberação de superóxido, podendo ser produzida por ampla variedade de células (leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais) (Adams e Lloyd, 1997). De maneira similar ao aumento da citocina IL-6 na PE, a quimiocina IL-8 também está elevada no sangue materno de pacientes com PE, contribuindo para a hipótese inflamatória e perfil Th1 (Koçyigit et al, 2004; Jonsson et al, 2006).

1.2.6 Interleucina 15

As principais fontes de produção de IL-15 são as células fagocíticas mononucleares (monócitos ativados), células epiteliais, fibroblastos e placenta (Borish e Steinke, 2003). A IL-15 é indutora da proliferação de células T, maturação de células B e é fundamental para o desenvolvimento e citotoxicidade da célula NK (Lodolce et al, 2002; Becknell e Caligiuri, 2005). A IL-15 tem ação quimiotática para linfócitos T e estabelece um mecanismo pelo qual as células fagocíticas mononucleares podem regular a proliferação das células NK e linfócitos T (Borish e Steinke, 2003). Hu e colaboradores (2007) demonstraram o aumento sérico materno das citocinas inflamatórias IL-15 e IL-16 em mulheres com PE.

1.2.7 Interleucina 16

A IL-16 inibe a liberação de IL-4 e IL-5 das células T o que diminui a atividade Th2 promovendo uma alteração no equilíbrio Th1/Th2 e ocasionando queda da capacidade anti-inflamatória (Pinsonneault et al, 2001). A IL-16 é produzida em vários tecidos como células dendríticas, monócitos ativados e fibroblastos (Lodolce et al, 2002; Lynch et al, 2003; Hu et al, 2007). IL-15 e IL-16 estão reconhecidamente aumentadas em doenças inflamatórias como lúpus eritematosos sistêmico, artrite reumatoide, doenças alérgicas, doença de Kawasaki dentre outras (Seegert e Schreiber, 2002; Jang et al, 2003; Karaki et al, 2005). Hu e colaboradores (2007) de acordo com a teoria inflamatória na PE demonstraram aumento das citocinas IL-15 e IL-16 no soro materno dessas gestantes.

1.2.8 Fator Solúvel Tipo Tirocinaquinase-1

O Fator Solúvel Tipo Tirocinaquinase-1 (sFlt-1) também conhecido como Receptor do Fator de Crescimento Endotelial 1 (VEGF-R1) é secretado pelo sinciciotrofoblasto. Contém um domínio de ligação extracelular perdendo as porções citoplasmáticas e transmembrana do VEGF-R1, o que lhe dá a capacidade de ligar ambos, VEGF e PlGF (Kendall et al, 1996; Mutter e Karumanchi, 2008). Em pacientes com PE, o aumento de sFlt-1 sérico está associado à diminuição de VEGF e PlGF no soro materno (Maynard et al, 2003). A hipóxia estimula a liberação de sFlt-1 pela placenta, o qual liga-se ao VEGF e inativa-o, induzindo desta forma disfunção endotelial sistêmica por ação antiangiogênica (Nevo et al, 2006; Redman e Sargent, 2009).

O endotélio dos capilares renais são extremamente sensíveis ao VEGF o qual é produzido localmente pelos podócitos (epitélio visceral) e este fato pode explicar porque a disfunção renal é um importante e precoce marcador da PE (Kitamoto et al, 2001; Sugimoto et al, 2003). VEGF é importante para manter a fenestração normal das células endoteliais renais. Na PE, a sinalização de VEGF diminuída devido à excessiva liberação de sFlt-1, promove mudanças glomerulares com endoteliose e proteinúria (Sugimoto et al, 2003; Mutter e Karumanchi, 2008). O sFlt-1 tem sido citado como responsável pelo fenótipo clínico da PE, ou seja, associado à hipertensão arterial sistêmica promovida pela disfunção endotelial e proteinúria que, por sua vez, é provocada pela endoteliose glomerular (Mutter e Karumanchi, 2008).

1.3 RANTES (CCL5)

Quimiocinas são famílias de proteínas estruturalmente relacionadas que compartilham a capacidade de induzir quimiotaxia. Ou seja, migração de linhagens específicas de leucócitos com importância na especificidade entre mononucleares ou polinucleares, estabelecendo, assim, diferenciação na atração e ativação leucocitárias de maneira seletiva. Estas citocinas especializadas desempenham um papel crítico na geração da inflamação celular em situações como resposta na proteção contra patógenos invasores e processos patológicos associados à infecção ou a doenças imunes. Quimiocinas são mais que simples fatores quimiotáticos, elas também estão implicadas na ativação e no controle do tráfico leucocitário, angiogênese e função antimicrobiana incluindo uma condição protetora contra a infecção do vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) (Adams e Lloyd, 1997; Rollins, 1997). A expressão aumentada de RANTES está associada à ampla variedade de processos inflamatórios como rejeição de transplantes, aterosclerose, artrite, dermatites atópicas, atopias respiratórias como asma, reações de hipersensibilidade tardia, glomerulonefrite, endometriose, Doença de Alzheimer e certos tumores malignos (Appay e Rowland-Jones, 2001; Saad-El-Din Bessa et al, 2012).

Quimiocina, do ponto de vista bioquímico (Adams e Lloyd, 1997), estabelece RANTES como uma pequena proteína composta por 68 aminoácidos, com baixo peso molecular - 8 à 12 kD (Rollins, 1997). Os domínios das quimiocinas, responsáveis pela especificidade da ação biológica, são definidos pela presença de quatro resíduos de cisteína em posições fortemente conservadas. Uma das principais famílias de quimiocinas a “CXC” ou α -quimiocina possui um resíduo de aminoácido entre dois resíduos de cisteína na porção amino terminal; a outra grande família de quimiocinas é a “CC” ou β -quimiocina que não possui aminoácido entre os

resíduos de cisteína adjacentes, conforme esquematizado na Figura 1 adaptada de Adams & Lloyd, 1997 (Adams e Lloyd, 1997; Rollins, 1997).

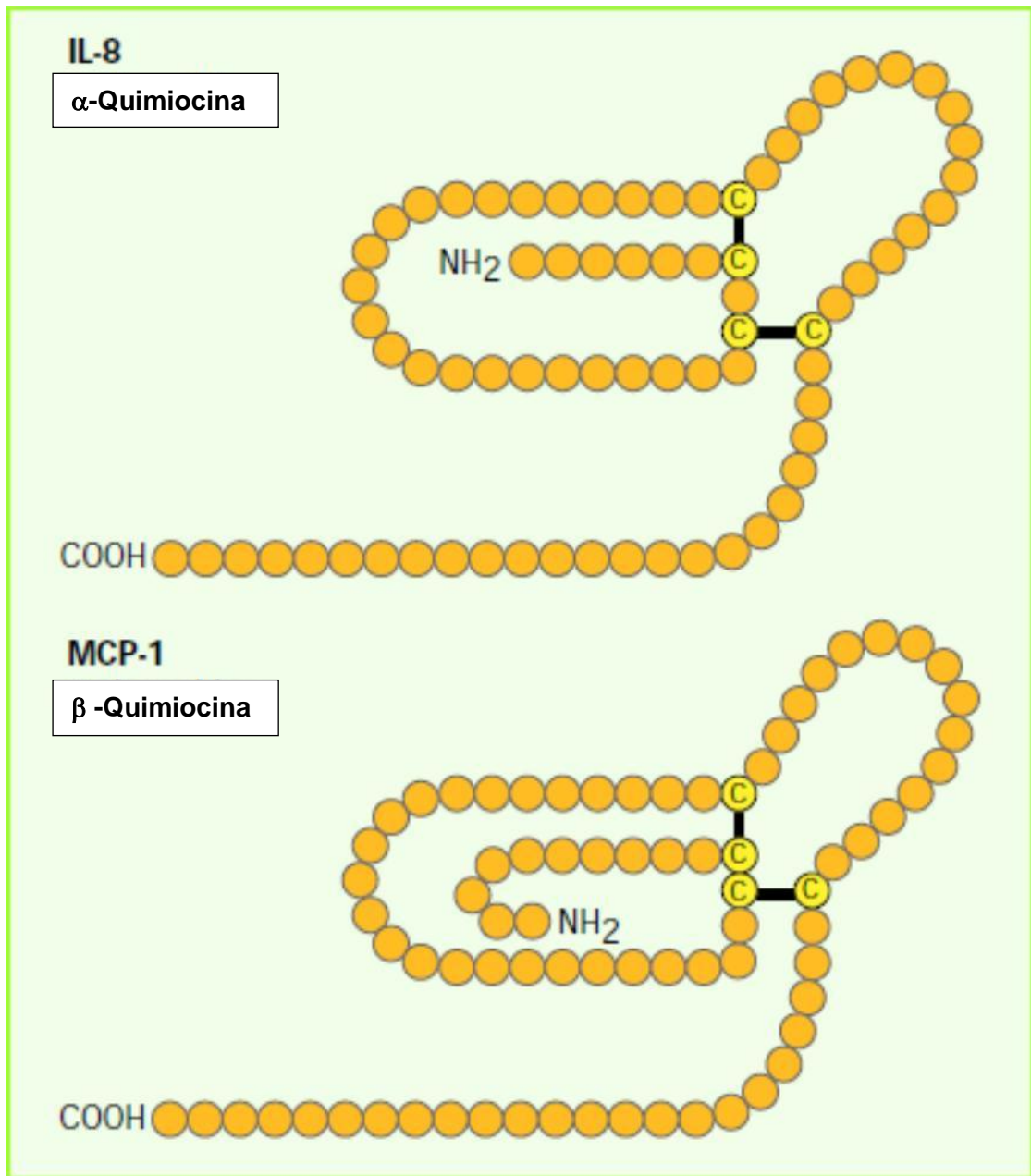


Figura 1 - Protótipos Estruturais de Quimiocinas α e β . Adaptado de Adams & Lloyd (1997).

A secreção de quimiocinas é induzida por citocinas inflamatórias Th1 como IL-1, IL-2, TNF- α e produtos bacterianos de lipopolissacarídeos (LPS) e a inibição da produção e liberação de quimiocinas pode ser creditada à ação de citocinas Th2

como IL-4 e IL-10 (Adams e Lloyd, 1997). A capacidade das quimiocinas de promoverem migração leucocitária é, provavelmente, sua mais importante função biológica. As quimiocinas contribuem para o recrutamento leucocitário primeiramente por integrinas ativadas (moléculas expressadas por leucócitos que mediam a adesão para células endoteliais e proteínas da matriz extracelular) e, secundariamente por promover migração dos leucócitos aderidos ao endotélio, através da matriz extracelular em um processo conhecido como haptotaxia (Springer, 1994; Adams e Lloyd, 1997).

A composição celular e a duração da resposta inflamatória dependem da natureza do estímulo seguido e do microambiente no qual ele ocorre. Neutrófilos mediam uma resposta aguda, rápida para infecção ou tecido lesado. Ao contrário, monócitos e linfócitos são tipicamente recrutados durante a inflamação crônica, como na resposta de hipersensibilidade tardia. O recrutamento de eosinófilos é um feito relevante das respostas alérgicas e parasitoses (Ebnet et al, 1996; Adams e Lloyd, 1997). Além do recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, quimiocinas são também importantes reguladores da ativação leucocitária. As quimiocinas “CC” possuem um amplo espectro de ação com atração de linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, e células NK, participando da regulação de linfócitos, processo inflamatório, hematopoiese, imunidade antitumoral e em alguns casos proteção contra a infecção pelo HIV (Rollins, 1997).

Assim como a IL-8 é considerada a quimiocina protótipo da família “CXC” na quimiotaxia, sobretudo na atração de polinucleares como neutrófilos, a Proteína Quimioatraente de Monócitos 1 (MCP-1) é considerada o protótipo da família “CC” na ação biológica, atraindo mononucleares e também eosinófilos e basófilos (Rollins,

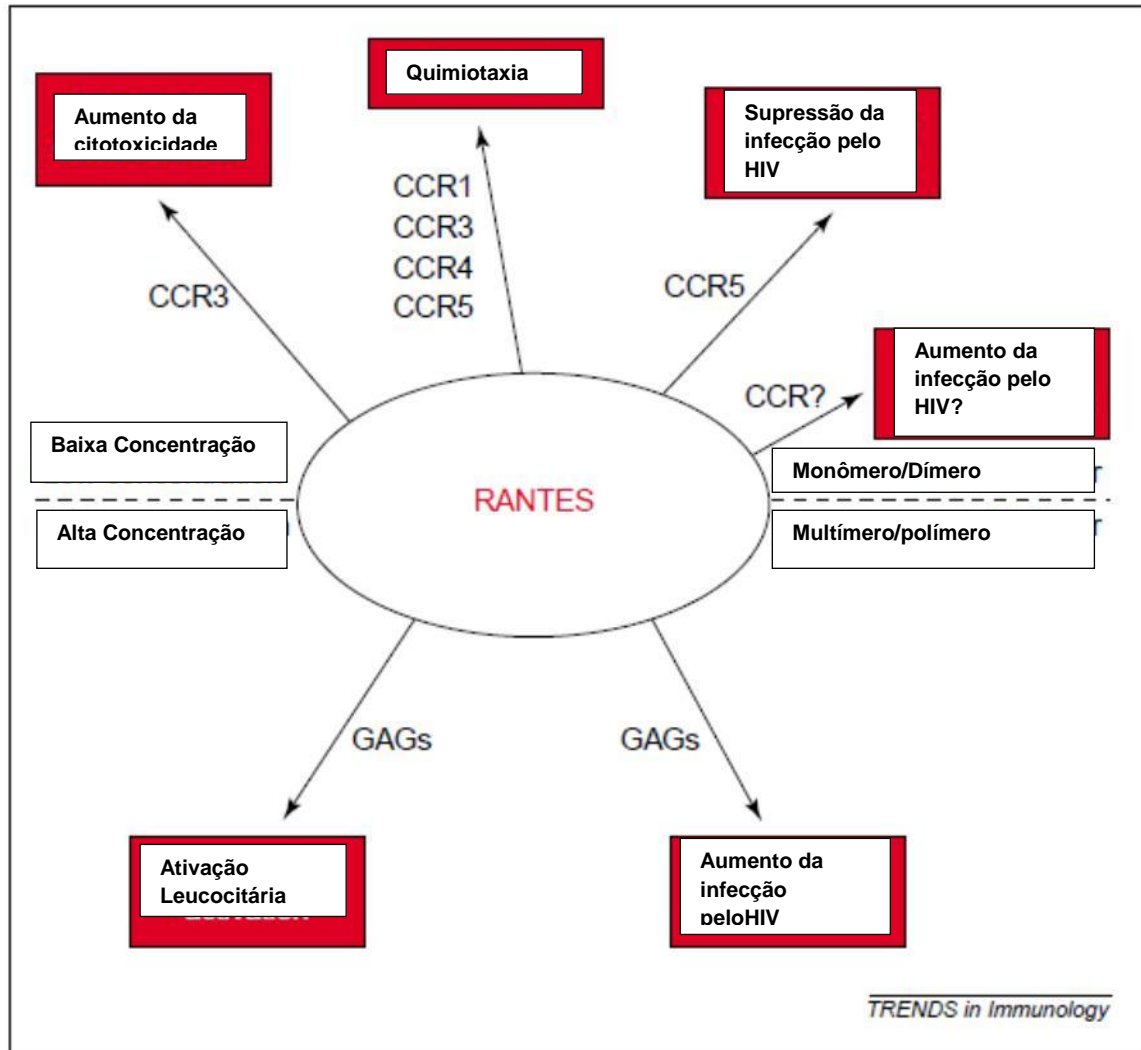
1997). MCP-1 foi inicialmente purificada de células musculares lisas da porção medial da artéria aorta de babuínos (Valente et al, 1988).

RANTES, molécula isolada por Schall e colaboradores em 1988 numa triagem diferencial entre células B e T, é considerada uma quimiocina "CC". Compartilha ação de quimiotaxia com a MCP-1, sendo a exocitose a diferença entre estas duas moléculas, pois na liberação de RANTES este fenômeno é bem menos estimulado (Schall et al, 1988). Sua principal ação fisiológica é atrair e recrutar linfócitos T de memória CD45RO+ (CD45RO) e Linfócitos T Auxiliar CD4+ (CD 4) em células endoteliais e no sistema transendotelial. Além de CD4 atrai também Linfócitos Supressores CD8+ (CD 8) sendo considerada a molécula de ação quimiotática mais potente para células CD8+. Age como um ativador, independente de antígeno, das células T mediante respostas celulares como abertura dos canais de cálcio e liberação de citocinas (Roth et al, 1995; Rollins, 1997).

As quimiocinas podem ligar-se aos proteoglicanos no glicocálice endotelial, envolvendo-os para agir como ligantes imobilizados na parede vascular localizada nos locais de inflamação sem serem arrastados pelo fluxo da corrente sanguínea (Ebnet et al, 1996). A afinidade de quimiocinas por proteoglicanos em particular pode variar entre tecidos distintos e durante a inflamação (Ebnet et al, 1996). RANTES está envolvido no processo de apoptose com a despolarização celular induzida pelo influxo prolongado de cálcio (Ca^{++}) e liberação de citocinas inflamatórias promotoras de adesão/agregação celular, especialmente através de proteoglicanos também conhecidos como glicosaminoglicanos (GACs) (Appay e Rowland-Jones, 2001). O complexo da ligação dos GACs com quimiocinas é um pré-requisito para a ligação das quimiocinas com seus receptores e a interação quimiocina/GACs potencializa a atividade de citocinas quimiotáticas (Rek et al,

2009). De acordo com Rollins (1997), os cinco diferentes tipos de receptores específicos para quimiocinas do tipo “CC” mostram especificidade cruzada para as citocinas, sendo exceção a eotaxina que se liga somente ao receptor CCR3 e MIP-1 α que por sua vez liga-se ao receptor CCR5. Apesar do receptor CCR3 ligar-se à RANTES com alta afinidade, o receptor CCR5 é que apresenta a maior afinidade, além da alta afinidade também com MIP-1 α e MIP-1 β (Gao et al, 1993; Neote et al, 1993). Além destes, os receptores CCR1 e CCR4 também podem ligar-se (Appay e Rowland-Jones, 2001).

Os efeitos de RANTES podem ser separados em dois grupos de acordo com sua concentração conforme Figura 2 adaptada de Appay & Roland-Jones (2001). Em baixas concentrações, a molécula atua, na forma monomérica ou dimérica sobre seus receptores específicos CCR1, CCR3, CCR4 e CCR5 promovendo quimiotaxia, mobilização transitória de cálcio e supressão da infecção do HIV através da alta afinidade da ligação com estes tipos de receptores (Appay e Rowland-Jones, 2001; Rek et al, 2009). Além de RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β são as outras quimiocinas “CC” capazes de inibir a entrada do vírus HIV nos macrófagos pela competição com os receptores CCR, diminuindo a infectividade do HIV (Hariharan et al, 2000).



Fonte: Adaptado de Appay & Roland-Jones (2001).

Figura 2 - Influência da concentração de RANTES na ligação celular.

Em altas concentrações, RANTES promove autoagregação formando multímeros/oligômeros (agregados) e atua através de interação seletiva com GACs na superfície celular (Appay e Rowland-Jones, 2001; Mbemba et al, 2001; Proudfoot et al, 2001; Rek et al, 2009). Esta situação induz diminuição da afinidade da proteína tirosina quinase, sinalizando uma via celular que leva à ativação e proliferação de células T (Rek et al, 2009). RANTES promove a indução da expressão da IL-2, agregação homotípica e expressão aumentada de moléculas de superfície celular como os receptores de IL-2 (Rek et al, 2009). De fato, a expressão aumentada de GACs durante a inflamação é sugerida por Rek e colaboradores (2009) para interagir com as altas taxas de quimiocinas disponibilizadas estabelecendo gradiente para uma resposta inflamatória.

A agregação é um pré-requisito para a atividade biológica inflamatória de RANTES, pois a sua oligomerização e a ligação com GACs é necessária para a atividade quimiotática “in vivo” (Proudfoot et al, 2003). A migração leucocitária induzida pelo RANTES deve-se à ligação desta quimiocina com os receptores acoplados a Proteína-G transmembrana-7, pois a molécula liga-se ao endotélio ativado promovendo a migração celular por haptotaxia, sugerindo desta maneira uma ação bem definida nos processos inflamatórios (Wiedermann et al, 1993; Von Luettichau et al, 1996). A afinidade pelos GACs é dependente de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, as quais contribuem significativamente para a ligação de alta afinidade da molécula por estes tipos de receptores (Rek et al, 2009). A interação GAC/RANTES produz uma mudança na forma da quimiocina induzindo e facilitando a formação dos oligômeros como pré-requisito para a ativação leucocitária (Rek et al, 2009). Deste modo, a quimiocina atua como um modulador imunológico na forma agregada (Rek et al, 2009). As variações não

agregadas de RANTES (monômeros ou dímeros) têm pouco ou nenhum efeito na ativação leucocitária (Appay et al, 1999).

Os principais membros da família dos GACs são os oligossacarídeos heparina e sulfato de heparan, consistindo de uma cadeia linear de 20-100 unidades de dissacarídeos, compostos de N-Acetil-D-glicosamina e ácido D-glicurônico, os quais podem ser modificados para incluir uma sulfatação de Nitrogênio ou Oxigênio além da epimerização do ácido β -D-glicurônico para ácido α -D-glicurônico. (Mbemba et al, 2001). O aumento da expressão e da quimiotaxia de RANTES em doenças do tecido reprodutivo, sobretudo na endometriose, está bem documentada (Hornung et al, 2001; Kalu et al, 2007; Chun-Li F, 2009).

A PE é considerada a síndrome de várias teorias e RANTES pode ter um papel importante nas duas mais aceitas, ou seja, teoria da má adaptação imune materno-fetal e a teoria inflamatória (Xia & Kellems, 2009; Sibai et al, 2005; Redman et al, 1999; Dekker & Sibai, 1998). A teoria da má adaptação imune materno-fetal pode ser a principal causa da placentação superficial e conseqüente estímulo inflamatório materno com ativação Th1 (Sibai et al, 2005). A subpopulação leucocitária é uma característica primária intrínseca da decídua uterina, independente da gestação e as células NK estão sobre efeito da regulação hormonal em roedores e humanos, aumentando na fase lútea pós ovulatória e predominando até o terceiro trimestre da gestação (King et al, 1997). Além disso, estudos imunohistoquímicos demonstram que 30-40% das células estromais da decídua humana, no início da gestação, são leucócitos, sendo que mais de 70% desses leucócitos deciduais são células NK CD56 (Bulmer et al, 1991; Moffett-King, 2002).

Durante o início da gestação células NK uterinas acumulam como um infiltrado denso envolvendo as células trofoblásticas invasoras (Croy et al, 2003, van

der Meer et al, 2004). Da metade da gestação em diante, estas células NK uterinas progressivamente desaparecem, o que coincide com a invasão citotrofoblástica, em que a placentação humana se completa ao redor da 20ª semana de gestação (Sibai et al, 2005). Células NK uterinas afetam ambas, invasão trofoblástica e a modificação das artérias espiraladas uterinas através da produção de citocinas que estão implicadas na angiogênese e estabilidade vascular (Sibai et al, 2005; van der Meer, 2004; Croy et al, 2003). Um dos principais produtos das células NK é a produção de IFN- γ , que fisiologicamente é essencial na modificação das artérias espiraladas uterinas (Croy et al, 2003).

Von Rango e colaboradores (2001) associando os efeitos da invasão trofoblástica com subpopulações leucocitárias no útero e nas trompas de Falópio mostraram que a grande quantidade de células NK inibe a implantação, inclusive especulando que o alto grau de invasão trofoblástica na parede tubária durante a gravidez ectópica pode estar associado à ausência de células NK nesse tecido. Células CD 8 e macrófagos CD 68 também mostraram uma forte associação com células trofoblásticas (Von Rango et al, 2001). Células NK são linfócitos do sistema imune inato, envolvidas na defesa precoce contra células estranhas, agentes infecciosos e células tumorais (Croy et al, 2003; Moretta e Moretta, 2004; Terme, 2005). Quando ativadas exercem ação citotóxica induzindo apoptose em células alvos, com liberação de grande quantidade de citocinas como IFN- γ , TNF- α , e GM-CSF, além das quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (Moretta e Moretta, 2004; Terme, 2005).

Além disso, há estudos prévios relatando o fato da PE, principalmente a precoce, estar associada à diminuída placentação ocasionada pela pobre invasão trofoblástica nas artérias uterinas espiraladas, sendo as células NK, sobretudo a

subpopulação e CD56^{bright} e linfócitos CD8⁺ relevantes para o processo de implantação e, conseqüentemente, cruciais para a placentação normal (King et al, 1997; Von Rango et al, 2001; Terme, 2005; Scaife et al, 2006; Williams et al, 2009).

RANTES também estimula a atividade citotóxica de células CD8⁺ e células NK (Taub et al, 1996). RANTES e MIP-1 α aumentam a proliferação de células T devido ao aumento da expressão B7 nas células apresentadoras de antígenos e também por aumentar a produção de IL-2 de células T ativadas (Bacon et al, 1995). De particular importância é o fato de IL-2 e IL-12 ativarem e estimularem as células NK a promoverem a morte de células trofoblásticas no primeiro trimestre de gestação, pois estas células, juntamente com linfócitos T reconhecem a invasão trofoblástica promovendo apoptose para prevenir a superinvasão de células fetais (King et al, 1997; Von Rango et al, 2001; Terme, 2005; Scaife et al, 2006; Williams et al, 2009). A produção de IL-2 leva à produção de IFN- γ pelas células NK aumentando a sua toxicidade. IL-2 e IFN- γ detectados na decídua são secretados por células T e NK ativadas, as quais se encontram presentes neste local durante o início da gravidez humana (Scaife et al, 2006; Williams et al, 2009). O estudo de RANTES adquire relevância pelo fato de a pobre placentação, feito comum na PE, estar associada a células NK, CD8⁺ e macrófagos CD 68⁺, todas elas alvos primários desta quimiocina, através da quimiotaxia, liberação de IL-2 e ativação leucocitária. Além disso, estas células estimuladas e ativadas secretam citocinas que possuem um alto grau de envolvimento na síntese e na liberação da quimiocina estudada nesta tese.

De fato, várias citocinas inflamatórias estão documentadas na PE como TNF- α , IL1- α , IL1- β , IL-6 e IL-8, sendo algumas delas relacionadas diretamente na síntese e liberação de RANTES (Dekker e Sibai, 1998; Redman et al, 1999; Benyo

et al, 2001; Jonsson et al, 2006; Mutter e Karumanchi, 2008). Em todas estas patologias citadas, esta proteína atua promovendo infiltração leucocitária para os locais de inflamação.

Há também estudos sobre ação quimiotática de RANTES em linfócitos T na inflamação, associando o recrutamento de dessas células ao local inflamado em patologias distintas como endometriose ou lúpus eritematoso sistêmico. Inclusive associa a expressão dessa molécula com os marcadores de atividade inflamatória do lúpus (C3, C4, ANA, Anticorpos anti-ds-DNA, Anti-corpos anti-Sm, Anti-corpos anti-SSB e IgG) e com a severidade da endometriose, neste caso pela detecção de monócitos nas células endometriais (Hornung et al, 2001; Lu et al, 2012). Vale ressaltar que a expressão do mRNA de RANTES pode ser inibida por corticosteroides (Wingettr et al, 1996).

A produção de RANTES, a qual é gerada predominantemente por linfócitos T CD8⁺, e também por células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos e plaquetas, é um fato importante na inflamação (Appay e Rowland-Jones, 2001). A interação das citocinas TNF- α e IFN- γ possui um efeito sinérgico na produção de RANTES nas células endoteliais e nos fibroblastos evidenciando que a combinação destas duas citocinas Th1 seja um fator determinante para a regulação da sua produção pelo aumento de mRNA desta quimiocina (Marfaing-Koka et al, 1995).

Mais recentemente, Nakada e colaboradores (2009) mostraram que a produção intracelular aumentada de RANTES induzida pela expressão de mRNA lipossomal nas células trofoblásticas foi via dependente dos receptores tipo –Toll “Toll-like receptor 3” (TLR3), através de encapsulação dos lipídios de membrana. Sugerindo à molécula quimioatraente também um papel na sinalização celular da inflamação, pois TLR3 induz os marcadores celulares da inflamação como o

aumento da produção e da ativação intracelular do marcador NF- κ B, além do aumento da síntese de RANTES. Embora células do estroma endometrial não secretem RANTES sob condições basais, a associação entre TNF- α e IFN- γ ambas citocinas aumentadas na PE, induziram a expressão “in vitro” de mRNA da própria quimiocina neste tecido (Hornung et al, 2001).

A indução por TNF- α e IFN- γ foi relatada em outras células também, pois IFN- γ estimula a expressão em macrófagos (Devergne et al, 1994) enquanto TNF- α estimula a expressão de RANTES em fibroblastos, células mesangiais e células do epitélio tubular renal (Heeger et al, 1992; Rathanaswami et al, 1993; Pattison et al, 1994). O sinergismo entre TNF- α e IFN- γ tem sido descrito também em vários fenômenos associados à inflamação incluindo a atividade citotóxica de macrófagos, a produção de radicais livres, sobretudo espécies reativas de oxigênio, a produção de óxido nítrico e a expressão de moléculas de adesão (Feinman et al, 1987; Liew et al, 1990; Kamijo et al, 1993). Importante salientar que a produção de RANTES estimulada pelo sinergismo produzido pela ação conjunta das citocinas Th1 TNF- α e IFN- γ foi parcial e significativamente inibida pelas citocinas Th2 IL-4 e IL-13 (Marfaing-Koka et al, 1995). A maioria dos tecidos normais de pacientes adultos apresenta pouca ou nenhuma célula positiva para expressão de RANTES, assim como a maioria dos tumores e leucemias testadas por von Luetlichau e colaboradores (1996). A expressão aumenta nos locais de inflamação, sendo importante salientar os altos níveis expressos de mRNA e da própria quimiocina/proteína RANTES em megacariócitos, alguns tumores e alguns tecidos fetais, sobretudo nos megacariócitos no baço fetal de fetos de 22 semanas (Von Luetlichau et al, 1996).

Em tecidos fetais, células glomerulares, ocasionalmente expressaram RANTES, mas nas células dos túbulos proximais e no córtex renal a expressão é acentuada. Em geral, raras células durante o desenvolvimento fetal expressam RANTES, sendo exceção os megacariócitos no baço na hematopoiese extramedular e células mesangiais durante o desenvolvimento renal, com altos índices desta quimiocina no mesangio glomerular e nos túbulos proximais, o que sugere uma importância na organogênese renal, além da ação quimiotática para esta molécula (Von Luetlichau et al, 1996).

Infiltrado de células mononucleares é um dos marcadores de rejeição de transplantes de órgãos. RANTES está presente no infiltrado de células mononucleares do interstício, produzido pelas células epiteliais renais durante a rejeição de transplante renal, sendo sintetizado localmente no interior do local inflamado ligado ao endotélio ativado capaz de atrair monócitos por haptotaxia (Wiedermann et al, 1993). Apesar de a lesão renal (endoteliose glomerular) ser uma manifestação clínica característica da SPE e, além disso, haver uma associação importante de RANTES neste tecido em situações distintas como organogênese na fase fetal e rejeição em transplantes na fase adulta (Wiedermann et al, 1993; Von Luetlichau et al, 1996), há uma carência de publicações sobre esta molécula na PE e gestação normal.

Athayde e colaboradores (1999) em um dos raros trabalhos sobre esta molécula na gestação procurou estabelecer uma relação entre sua concentração no líquido amniótico e a idade gestacional. Encontraram uma diminuição da concentração desta quimiocina no líquido amniótico com o avanço da idade gestacional, estando, portanto, aumentada em pacientes com parto prematuro quando comparado com pacientes a termo (Athayde et al, 1999). A concentração de

RANTES também está aumentada no líquido amniótico durante o trabalho de parto e infecção bacteriana da cavidade amniótica induzida por endotoxinas bacterianas, fato que promove a quimiotaxia de monócitos e linfócitos (Athayde et al, 1999). Outras citocinas Th1 como TNF- α e IL-1 β também estão aumentadas durante a prematuridade do trabalho de parto ou nascimento (Matoba et al., 2009). Jonsson e colaboradores (2006) realizaram um mapeamento sérico de 22 citocinas, incluindo RANTES, em grupos de gestantes normais e com PE, relatando diferenças entre os grupos apenas nas concentrações de IL-6, IL-8 e receptor solúvel de IL-4. Hwang e colaboradores (2010) também não encontraram diferença nesta molécula entre gestantes normais e com PE, estudando a expressão de algumas dezenas de citocinas em células embrionárias mesenquimais placentárias.

Hariharan e colaboradores (2000), ao estudarem quimiocina “CC” em mononucleares, mostraram uma diminuição da expressão intracelular de RANTES em linfócitos do cordão umbilical em relação aos linfócitos do sangue periférico de adultos e produção pelas células mononucleares no cordão umbilical. Esta última devendo-se principalmente aos linfócitos CD8+/CD45RO (Hariharan et al, 2000). Além do alto coeficiente de correlação estabelecido entre as citocinas Th1, MCP-1, MIP-1 β e IL-8 no cordão umbilical, os resultados de Takahashi e colaboradores (2010) mostraram no cordão umbilical que esta quimiocina possui níveis mais elevados que as outras 14 citocinas estudadas.

Há um grande número de publicações sugerindo um caráter aterogênico de RANTES pela indução da migração leucocitária transendotelial, implicado nas fases iniciais da parte inflamatória do processo aterogênico (Simeoni et al, 2004). Tem sido proposto que quando estocado nas vesículas secretoras plaquetárias é liberado diante da ativação plaquetária e imobilizado na superfície do endotélio inflamado,

promovendo recrutamento de monócitos, aderindo-os às artérias ateroscleróticas e acelerando a formação dessas lesões assim como a formação de trombo (Von Hundelshausen et al, 2001; Huo et al, 2003). Há também estudos experimentais em ambas as situações, seja a deficiência de CCR5, principal receptor para os monômeros e dímeros de RANTES ou o uso de Met-RANTES, antagonista dos receptores de RANTES diminuindo a ação biológica desta molécula com redução da formação da placa aterosclerótica (Veillard et al, 2004; Zerneck et al, 2006).

O fundamento deste estudo está baseado no projeto de pós-doutorado da doutora Bartira E. Pinheiro da Costa realizado na University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi EUA. O referido trabalho realizou um estudo de rastreamento incluindo 120 citocinas avaliadas em tecido placentário e plasmas do cordão umbilical e mãe com e sem pré-eclâmpsia. Ficou demonstrado que gestantes com PE grave apresentam diferentes perfis de citocinas em comparação com gestantes normais, sugerindo que no arranjo de citocinas avaliado, o perfil da placenta, mãe e feto são distintos. Como o RANTES foi a única citocina que apresentou diferença estatisticamente significativa entre os três locais estudados quando da comparação entre os grupos, o presente estudo intencionou verificar o referido resultado numa amostra maior de pacientes. Está alinhado também com o propósito de publicações recentes (Cetin et al, 2011; Meiri et al, 2011) sobre a atualização de novos marcadores biológicos na PE, visando estabelecer um perfil da quimiocina RANTES em três locais distintos, na mãe e no recém-nascido em ambas as condições, PE e gestação normal.

2 HIPÓTESE

Os níveis da quimiocina inflamatória RANTES estão aumentados na pré-eclâmpsia em relação à gestação normal no tecido placentário, plasma materno e do cordão umbilical.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar a expressão de RANTES na placenta e plasmas materno e do cordão umbilical de gestantes normais e com pré-eclâmpsia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Em gestantes normais e com pré-eclâmpsia:

- Quantificar os níveis de RANTES nos plasmas materno e do cordão umbilical e no tecido placentário;
 - Comparar os níveis de RANTES nos três tecidos estudados;
 - Correlacionar os níveis de RANTES com a evolução clínica materno-fetal.
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

Foi realizado um estudo transversal em 69 gestantes que receberam tratamento obstétrico no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), em Porto Alegre: 33 com SPE e 36 gestantes normais.

4.2 CRITÉRIOS

A PE foi diagnosticada de acordo com o NHBPWGEPHBPP (2000), que estabelece aumento da pressão sanguínea a níveis mais elevados que 139/89 mmHg, após 20 semanas de gestação em pacientes previamente normotensas, acompanhada de proteinúria maior que 0.29 g/24h ou a relação proteinúria creatininúria maior que 0,3.

PE severa foi considerada se um ou mais dos seguintes marcadores estivessem presentes: pressão arterial sistêmica > 159/109 mmHg, excreção urinária de proteína maior que 4,9 g em amostra de 24 horas ou 3 a 4 + no exame qualitativo de urina (EQU) de amostra randomizada, Síndrome HELLP, trombocitopenia, epigástria, dor em quadrante superior direito, insuficiência hepática, edema

pulmonar, ou diagnóstico de distúrbio visual ou cerebral. As amostras das gestantes sem SPE foram obtidas da mesma maneira que das gestantes com a patologia. Dados perinatais como idade gestacional obstétrica, peso da placenta e do recém-nascido também foram adicionados ao trabalho.

Foram excluídas do estudo pacientes com história de diabetes, doenças renais, doença hepática, doença infecciosa, gestação múltipla e ruptura prematura de membrana. Gestação normal com 1+ na urinálise sendo considerada positiva para presença de proteína e trabalho de parto prematuro também foram excluídos do grupo controle. Todas as gestantes tiveram sorologia não reagente para HIV.

4.3 APROVAÇÕES DO ESTUDO

A pesquisa foi aprovada pela Comissão Científica da faculdade de Medicina/HSL-PUCRS, bem como pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (Nº 0527/07-CEP)(Anexo 1). Todas as participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

4.4 COLETAS

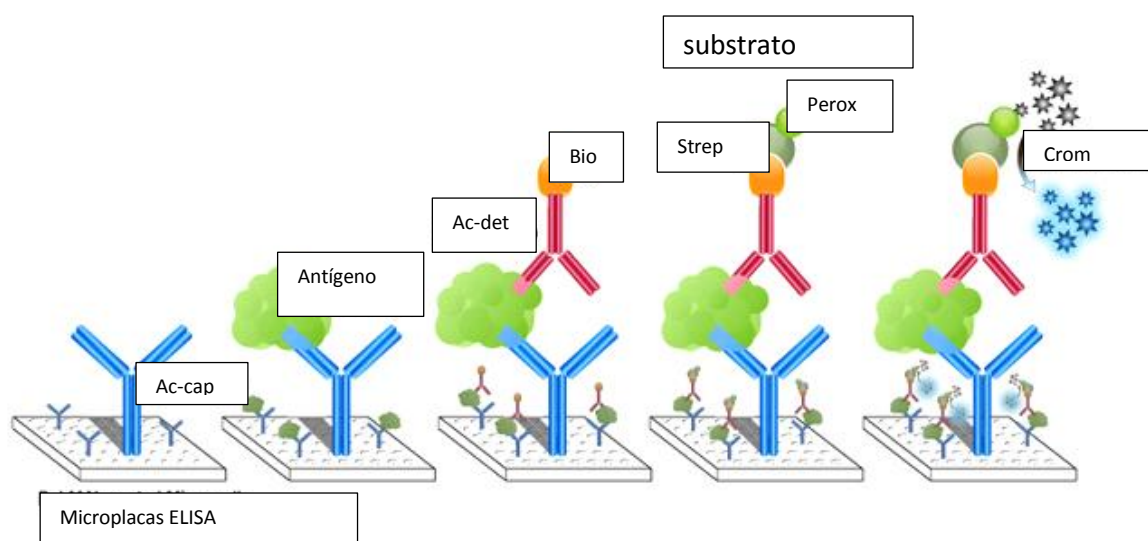
Na hora do parto, foram coletados das gestantes 4 mL de sangue periférico em tubo contendo EDTA como anticoagulante. Após o parto, foi puncionado 4 mL de sangue da veia do cordão umbilical e transferido para tubo contendo EDTA, e dissecados da face materna da placenta cubos de 1 cm³ do centro de um cotilédone localizado na metade da distância entre o cordão umbilical e a extremidade do

órgão. Este material foi lavado e colocado em criotubos contendo salina fosfatada tamponada (PBS) e após armazenado a -80°C . Os materiais coletados foram então trazidos para o Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas, sendo o sangue materno e do cordão umbilical centrifugados a 3.000 g por 10 minutos e estocados com a placenta a -80°C até o uso. As amostras de placenta foram, após o descongelamento à temperatura ambiente, maceradas e homogeneizadas adicionando 200 μl de tampão de lise (10mM Tris-HCl (pH 7.5); 1mM MgCl_2 , 1mM EDTA (0.5 pH 8.0); 0.1 mM de fluoreto de fenilmetanosulfanil 100mM; 5mM de beta-mercaptoetanol, 0,5% de ácido propanosulfônico 3[(3-colamidopropil)dimetilamônio]; 10 % glicerol; água bi-destilada, diluído para 2 mL de PBS 1X. As amostras foram centrifugadas a 4.000 g durante 10 minutos a 5°C ; o sobrenadante foi estocado a -80°C . As alíquotas de placenta foram submetidas à dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4.5 ENSAIOS

A concentração de RANTES em placenta e plasmas materno e do cordão umbilical foi verificada pelo teste imunoenzimático ELISA de captura (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) para humanos (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN-EUA). Nesta técnica, o anticorpo de rato anti-RANTES humano foi utilizado como anticorpo de captura na pesquisa da proteína RANTES (antígeno), o anticorpo humano biotilado anti-RANTES humano foi utilizado como anticorpo de detecção, a estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano silvestre foi usada como substrato e peróxido de hidrogênio como cromógeno para desenvolvimento de cor e consequente medida espectrofotométrica. Este método ELISA de captura ou

sanduíche é descrito desta maneira por utilizar anticorpo de captura inicial e também pelo fato do antígeno (RANTES) ficar no meio de dois anticorpos como um sanduíche conforme esquema na Figura 3.



Fonte: Adaptado de EPITOMICS® Company Cat. 6112-1.

Figura 3 – Etapas da metodologia de ELISA por captura (sanduíche). Legenda: Ac-cap (Anticorpo de captura); Ac-det (Anticorpo de detecção); Bio (Biotina); Strep (streptavidina); Perox (peroxidase) e crom (cromogéno).

A escolha de RANTES como citocina investigada advém das evidências da literatura, o papel das mesmas na resposta vascular e a diferença desta quimiocina constatada em estudo de rastreamento realizado em Jackson, Mississippi, Estados Unidos (dados não publicados) nos mesmos tipos de amostras investigadas no presente estudo. Os ensaios foram desenvolvidos em microplacas conforme recomendação do fabricante (Anexo 3). A intensidade da coloração foi medida em 450 nm utilizando-se um leitor de placa de ELISA. Para a validação do ensaio, foram realizados testes de diluição em amostras de placenta e plasma materno e do

cordão umbilical, tanto de SPE como de gestantes normais. Este procedimento foi feito para verificar qual a diluição que deveriam sofrer as amostras, considerando que o valor medido estivesse dentro do intervalo de linearidade da curva de calibração. As diluições em reagente diluente fornecido pelo *kit* ELISA foram: plasma materno 1:128; placenta 1:50 e plasma do cordão umbilical 1:300 vezes. A sensibilidade do teste ELISA utilizado está entre 10 e 1000 pg/mL. Após os ensaios, os valores medidos foram multiplicados pelo respectivo fator de diluição.

Após a realização dos testes de diluição, foram feitos ensaios para determinar o coeficiente de variação intra e inter-ensaio para dois avaliadores. Para estimar o coeficiente intra-ensaio, verificou-se nos três tipos de amostras incluídas no estudo, três medidas de três pacientes (2 SPE e 1 gestante normal) em triplicata, obtendo-se um coeficiente de 9 % para um dos avaliadores e 12 % para o outro; valores obtidos pelo cálculo da média entre as triplicatas das três medidas nas três amostras de cada paciente. Estes procedimentos foram repetidos por três dias consecutivos para os dois avaliadores também, alcançando o coeficiente de variação inter-ensaio, o valor de 5 % para o avaliador 1 e 10 % para o dois.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa Statistical Package for Social Sciences versão 17.0 (SPSS,17.0) para Windows. As variáveis contínuas foram descritas por medidas de tendência central e dispersão (média e desvio-padrão ou mediana e intervalo interquantil). Nas comparações entre os dois grupos foram empregados os testes t de Student ou U de Mann-Whitney. O teste do Qui-quadrado foi utilizado nas comparações das variáveis categóricas. Para as correlações entre

variáveis quantitativas de distribuição paramétrica foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, com significância determinada pelo teste t de Student. Correlações entre variáveis não-paramétricas foram testadas pelo teste de correlação de Spearman. Teste do Qui-quadrado seguido do Teste Exato de Fischer e Teste de Kruskal-Wallis foram usados para avaliar dependência entre variáveis não paramétricas. O nível de significância considerado foi de 0,05.

4.7 FOMENTO

O projeto recebeu apoio financeiro do CNPq (Edital Universal). O Grupo de Pesquisa da Faculdade de Medicina e o Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul recebem apoio do CNPq, CAPES, FINEP, FAPERGS, Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência e tecnologia do RS e da PUCRS.

5 RESULTADOS

O Anexo 6 apresenta o artigo contendo os principais resultados encontrados no presente estudo. O artigo foi submetido ao periódico *Obstetrics and Gynecology*, estando sob apreciação dos revisores.

A Tabela 1 resume as características clínicas e demográficas dos recém-nascidos e das mulheres com gestação normal e SPE. Idade materna, idade gestacional obstétrica, paridade, parto normal, raça, pressões sanguínea diastólica e sistólica, peso da gestante, glicemia, IMC (ajustado pela idade gestacional), peso do recém-nascido, peso da placenta, Apgar 1 e 5 minutos após nascimento e classificação do tamanho do recém-nascido foram comparados entre os grupos.

A Idade gestacional foi menor na SPE comparada à gestação normal. Pressões arteriais diastólica e sistólica foram maiores na SPE. Os pesos de RN de gestantes com SPE foram menores comparados com os pesos de RN de gestantes normais.

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos dos recém-nascidos e das gestantes.

	Gestação Normal (n=36)	Síndrome de Pré-eclâmpsia (n=33)	P
Idade Materna (anos)	25,6±5,2	26,3±6,7	0,617
Idade Gestacional Obstétrica (semanas)	39,5±1,5	36,0±4,5	<0,001*
Primiparidade: n (%)	16 (44,4)	23 (69,7)	0,109
Parto Normal: n (%)	26 (72,2)	8 (24,2)	<0,001**
Caucasiana: n (%)	18 (52,9)	20 (60,6)	0,818
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	116,7±10,6	156,6±18,6	<0,001*
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	74,5±7,3	100,8±14,3	<0,001*
Peso Materno(kg)	76,7±17,6	80,2±15,6	0,411
Índice de Massa Corpórea (Kg/m ²)	29,7±5,3	30,6±4,7	0,480
Categoria de Índice de Massa Corpórea :			0,768
Peso Normal: n (%)	13 (37,1)	10 (33,3)	
Sobrepeso Discreto: n (%)	11 (31,4)	10 (33,3)	
Sobrepeso Severo: n (%)	7 (20,0)	4 (13,3)	
Obesidade: n (%)	4 (11,4)	6 (20,0)	
Glicemia (mg/dL)	76,6±7,4	76,0±10,9	0,812
Peso do Recém-nascido(g)	3.397,4±464,7	2.683,0±1,014,8	<0,001*
Peso da Placenta(g)	644,1±148,3	575,2±187,9	0,097
Índice de Apgar (1º minuto)	8,1±1,7	7,5±1,7	0,152
Índice de Apgar (5º minuto)	9,1±1,8	8,8±1,1	0,421
Classificação do Recém- nascido			0,029 ^{***}
AIG, n (%)	27 (75,0)	26 (83,9)	
GIG, n (%)	9 (25,0)	2 (6,5)	
PIG, n (%)	0	3 (9,7)	

Teste-t; Teste do Qui-quadrado; Teste de Probabilidade Exata de Fischer; Teste do Qui-quadrado seguido por Teste Exato de Fisher.

* Estatisticamente significativo.

AIG, GIG e PIG: Apropriado, Grande e Pequeno para a idade gestacional, respectivamente.

A Figura 4 mostra que mulheres com SPE tiveram concentrações plasmáticas ($96,7 \pm 25,1$ ng/dL vs $42,8 \pm 17,8$ ng/dL) e placentárias ($210,0 \pm 85,8$ ng/g proteína vs $14,2 \pm 4,2$ ng/g proteína) de RANTES significativamente maiores que mulheres com gestação normal ($p < 0,001$). O plasma do cordão umbilical de recém-nascidos de mulheres com PE mostrou níveis diminuídos de RANTES comparado ao plasma do cordão umbilical de recém-nascidos de gestantes normais ($21,1$ ng/dL [p 25: 11,2 -P 75: 30,1] vs $198,8 \pm 24,2$ ng/dL; $p < 0,001$).

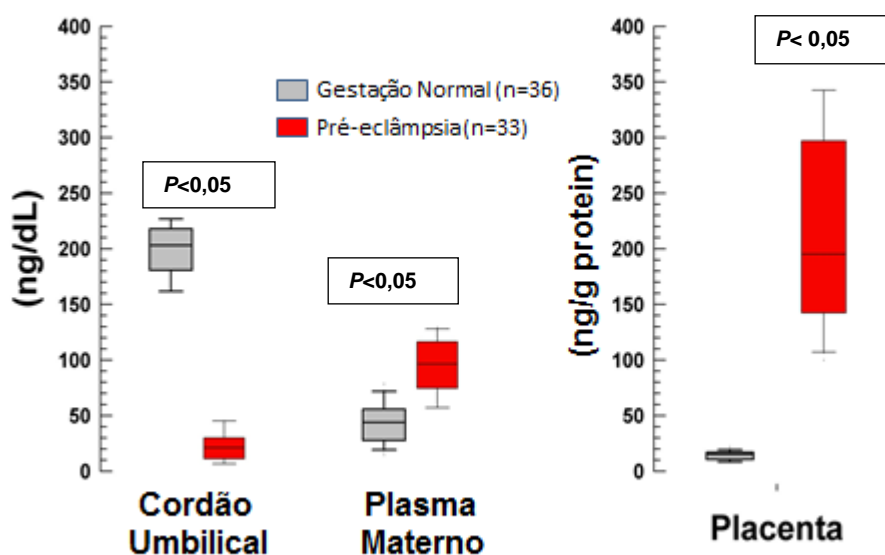


Figura 4 - Níveis de RANTES no plasma do cordão umbilical, plasma materno e placenta.

Houve uma correlação significativa entre a idade gestacional obstétrica e os níveis de RANTES na placenta, plasma materno e plasma do cordão umbilical de ambos os grupos, gestação normal e SPE (Pearson $r = -0,378$ $p = 0,01$; Pearson $r = -0,394$ $p = 0,01$ e Spearman $r = 0,432$ $p < 0,01$ respectivamente). A correlação foi

perdida quando ajustada pela regressão linear múltipla por classes (gestação normal e SPE)($p < 0,14$) conforme Figuras 5, 6 e 7.

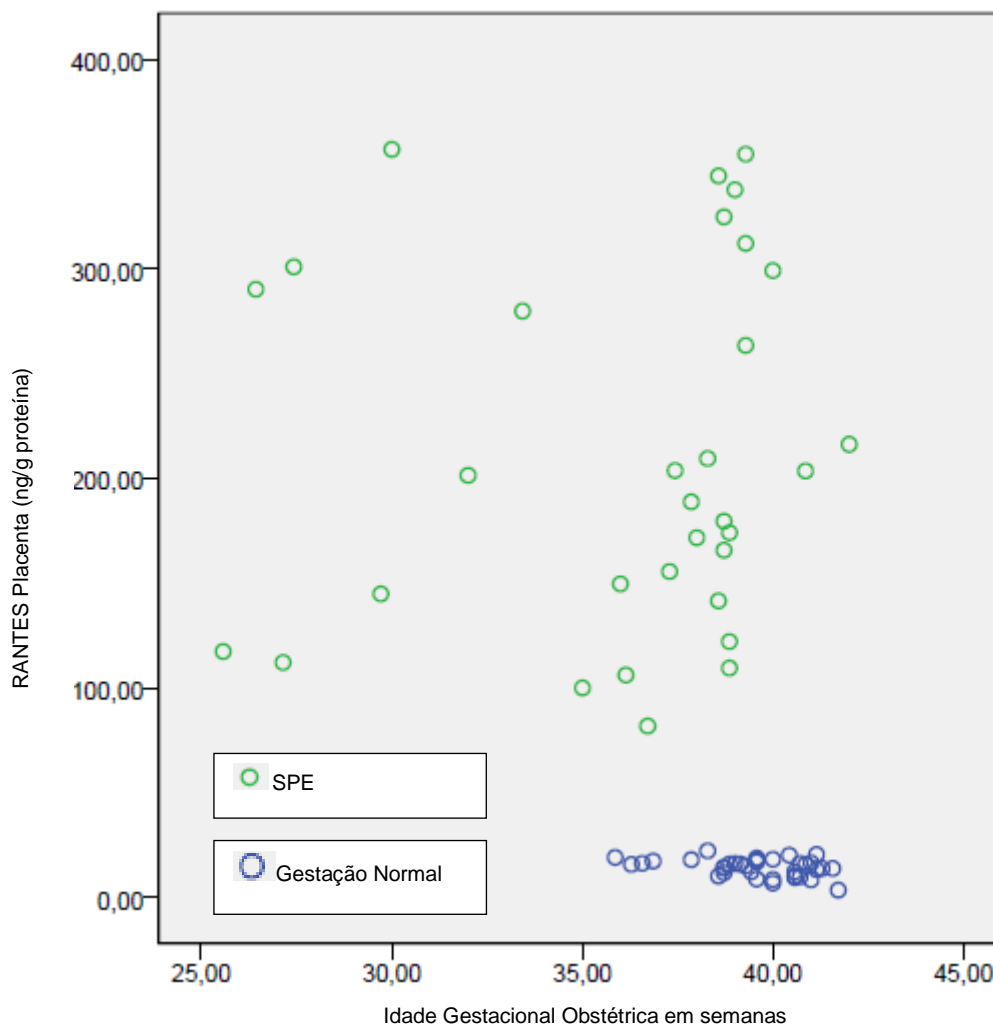


Figura 5 - Correlação entre níveis de RANTES na placenta e idade gestacional obstétrica.

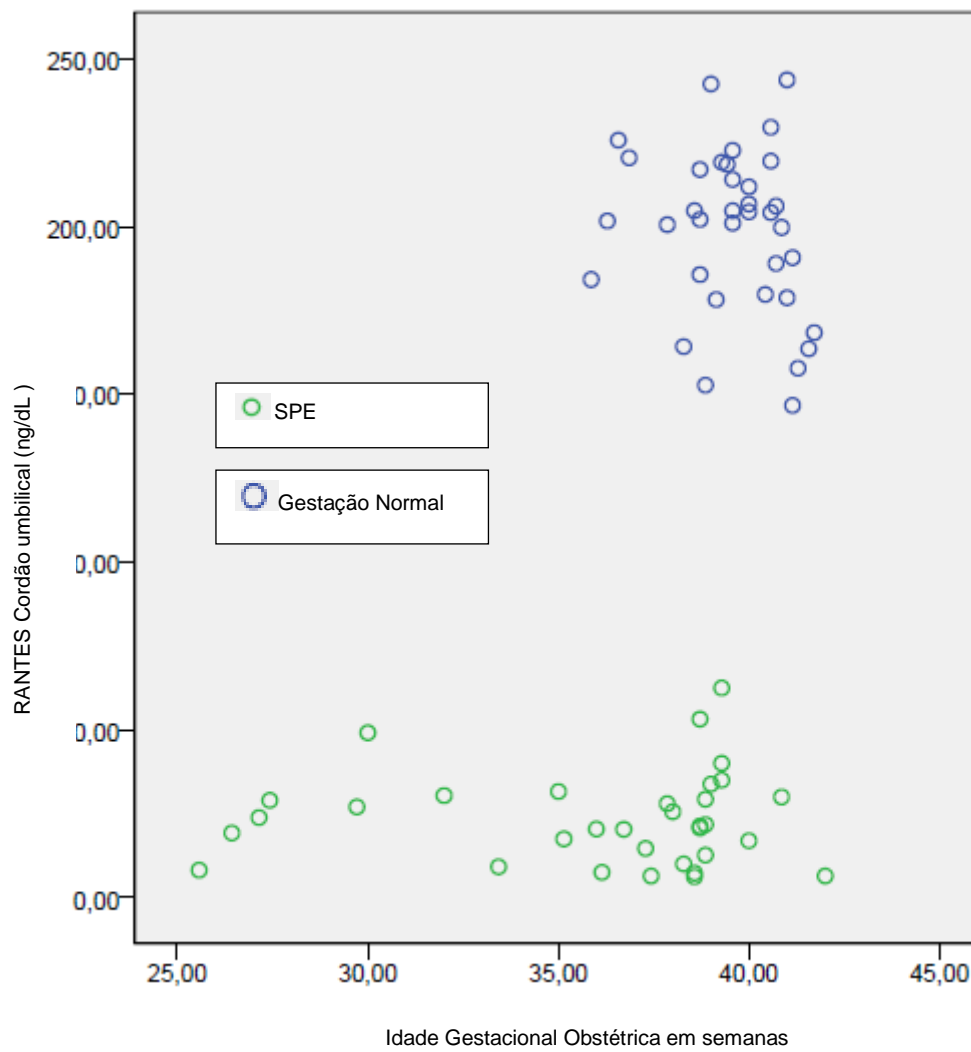


Figura 6 - Correlação entre níveis de RANTES no plasma do cordão umbilical e idade gestacional obstétrica.

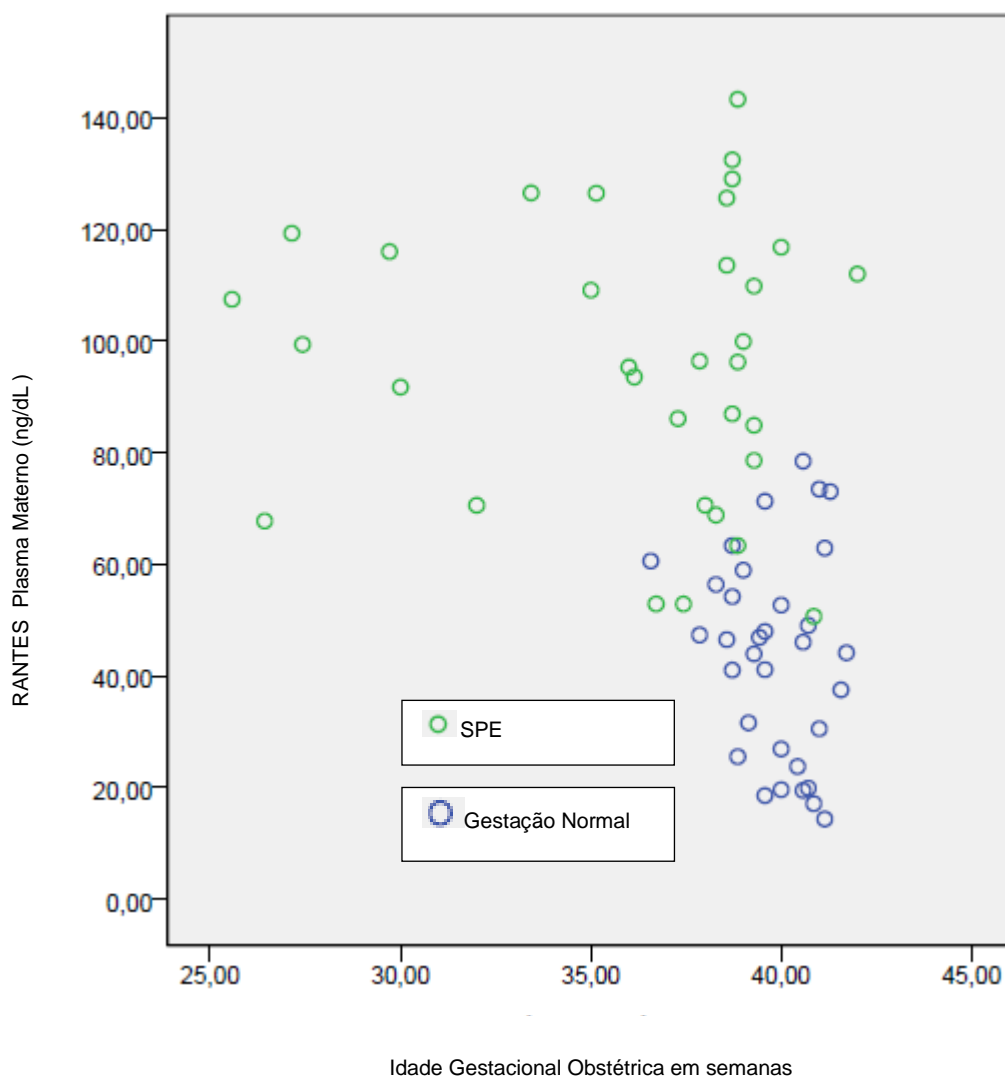


Figura 7 - Correlação entre níveis de RANTES no plasma materno e idade gestacional obstétrica.

A concentração de RANTES na placenta apresentou correlação positiva com a concentração de RANTES no plasma materno (Correlação de Pearson $r = 0,697$; $p < 0,001$). Este estudo mostrou correlações negativas consistentes nos níveis de RANTES entre as amostras maternas e do RN através das correlações de Spearman entre o plasma materno ($r = -0,751$; $p < 0,001$) e a placenta ($r = -0,818$; $p < 0,001$) correlacionados com o plasma do cordão umbilical, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Correlação de RANTES entre plasma materno, plasma do cordão umbilical e placenta.

RANTES	PLASMA MATERNO	CORDÃO UMBILICAL
Placenta	r=0,697 (Pearson) p<0,001	r= - 0,818 (Spearman) p<0,001
Plasma materno		r= - 0,751 (Spearman) p<0,001

A probabilidade da distribuição do tamanho do RN para a idade gestacional ter acontecido por acaso foi de somente 3% - isto se refere à distribuição da classificação dos recém-nascidos na SPE comparado com a gestante normal, pois somente no grupo SPE ocorreram RN pequenos para idade gestacional (p=0,028 na Tabela 1).

Apesar dos níveis de RANTES nos locais estudados não estarem associados ao IMC das gestantes neste trabalho, há uma tendência não significativa, de aumento de RANTES no plasma materno com o aumento do IMC das gestantes conforme Figura 8. Nenhuma associação foi detectada entre o RANTES da placenta ou plasma do cordão umbilical com o IMC (Figuras 9 e 10).

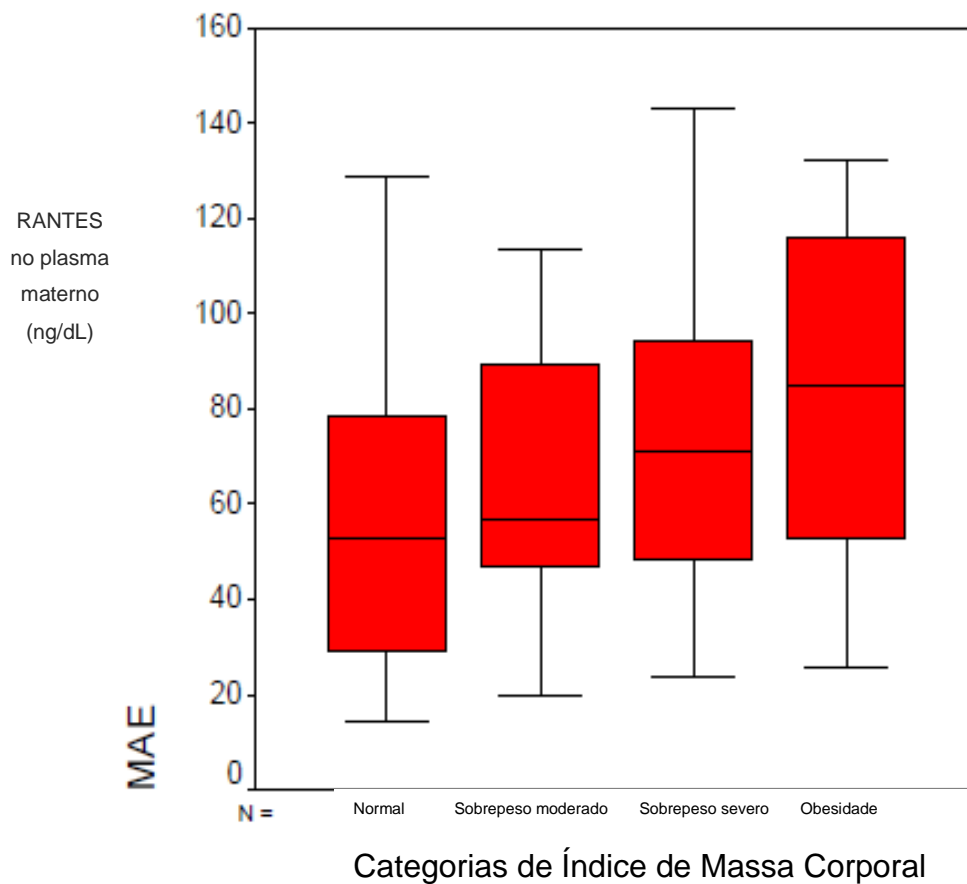


Figura 8 - RANTES no plasma materno conforme classificação do IMC das gestantes. Gestantes foram divididas em 4 grupos de acordo com IMC para gestantes (gráfico na página 14 do texto Índice de Massa Corporal acessado em 26 de abril de 2011 (em <http://sites.google.com/site/imc22indicedemassacorporal/>): gestantes com peso normal (IMC entre 18,5 e 24), sobrepeso moderado (IMC entre 24,01 e 30), sobrepeso severo (IMC entre 30 e 34) e obesidade (IMC entre 34,10 e 36,2).

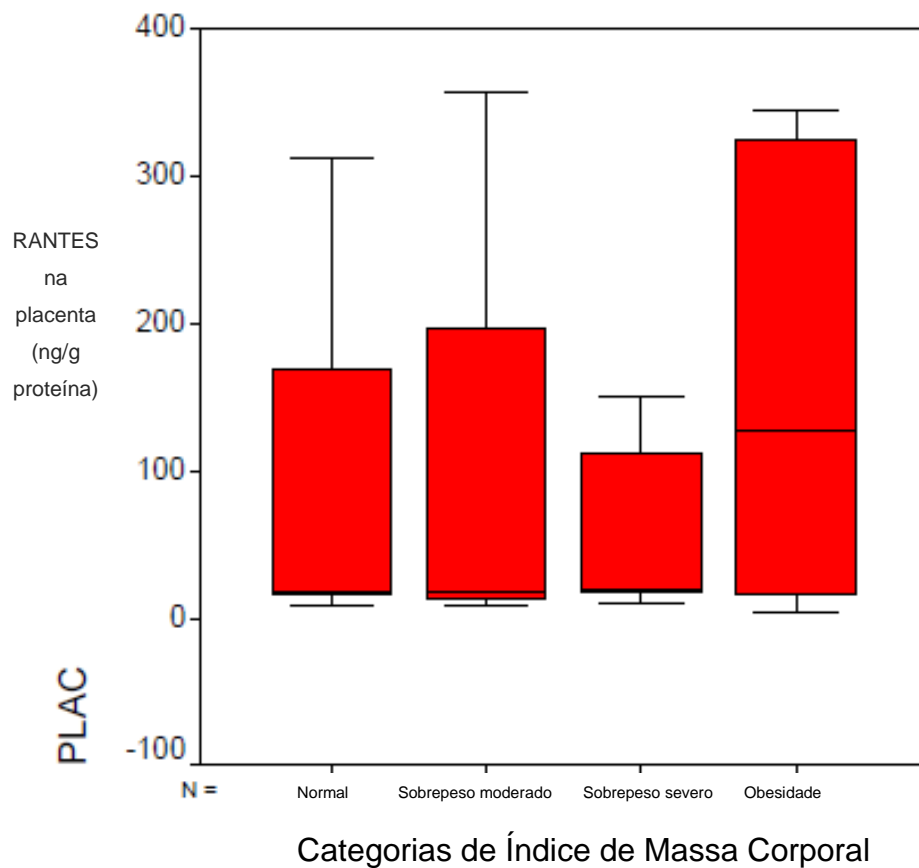


Figura 9 - RANTES no tecido placentário conforme classificação do IMC das gestantes.

Gestantes foram divididas em 4 grupos de acordo com IMC para gestantes (gráfico na página 14 do texto Índice de Massa Corporal acessado em 26 de abril de 2011 (em <http://sites.google.com/site/imc22indicedemassacorporal/>)): 1 são gestantes com peso normal (IMC entre 18,5 e 24), 2 sobrepeso moderado (IMC entre 24,01 e 30), 3 sobrepeso severo (IMC entre 30 e 34) e 4 obesidade (IMC entre 34,10 e 36,2).

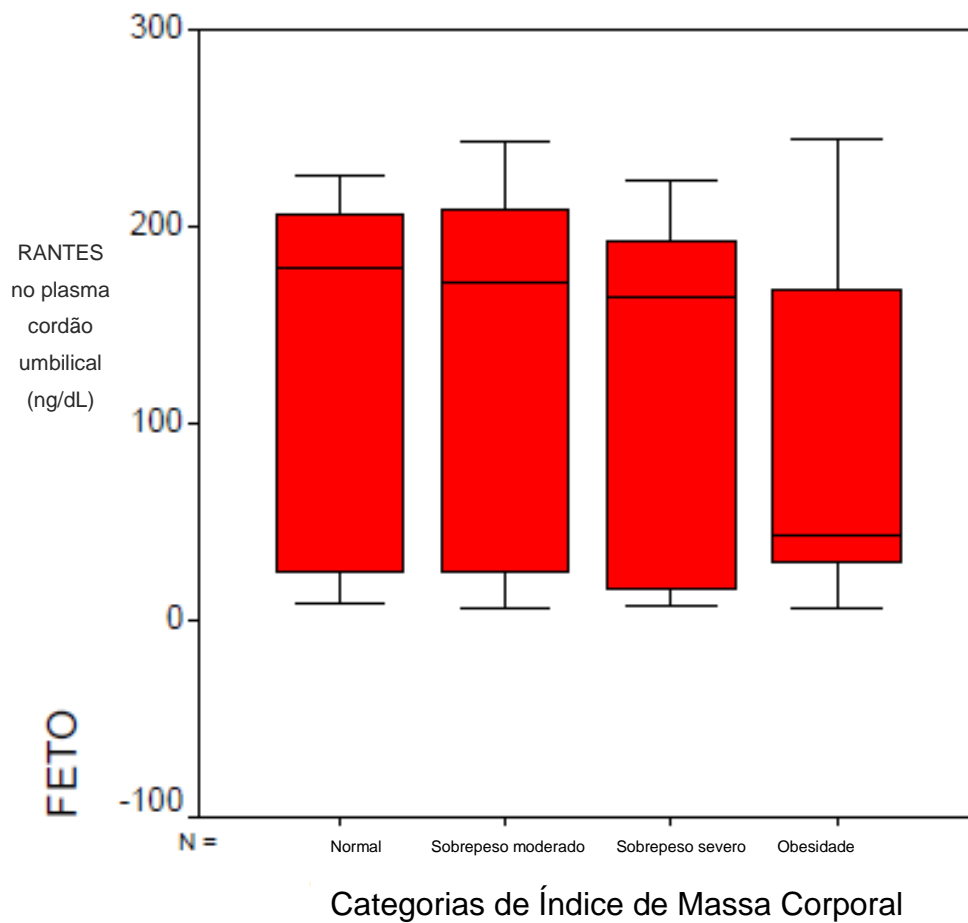


Figura 10 - RANTES no plasma do cordão umbilical conforme classificação do IMC das gestantes. Gestantes foram divididas em 4 grupos de acordo com IMC para gestantes (gráfico na página 14 do texto Índice de Massa Corporal acessado em 26 de abril de 2011 (em <http://sites.google.com/site/imc22/indexdemassacorporal/>)): gestantes com peso normal (IMC entre 18,5 e 24), sobrepeso moderado (IMC entre 24,01 e 30), sobrepeso severo (IMC entre 30 e 34) e obesidade (IMC entre 34,10 e 36,2).

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo sugerem uma diferença na resposta inflamatória entre a mãe e o RN, estabelecendo um perfil distinto da quimiocina RANTES em ambas as condições, SPE e gestação normal. De fato, há uma correlação consistentemente negativa dos níveis de RANTES entre amostras maternas (plasma materno e placenta) e amostra fetal (plasma do cordão umbilical). Os achados deste trabalho sobre os níveis de RANTES em amostras maternas (plasma materno e placenta) contribuem para a hipótese da resposta inflamatória materna aumentada na PE (Redman et al, 1999), considerando o aumento estatisticamente significativo dos níveis de RANTES das gestantes com SPE comparados com as gestantes normais. Este estudo, além de corroborar para a hipótese inflamatória da PE através do perfil materno desta molécula, vai ao encontro das publicações que associam esta quimiocina aos distintos processos inflamatórios amplamente investigados (Wiedermann et al, 1993; Gonzalo et al, 1996; Von Luetichau et al, 1996; Chihara et al, 1997; Hornung et al, 2001; Marcella et al, 2003; Kalur et al, 2007; Chun-Li F, 2009; Saad-El-Din Bessa et al, 2012).

A maior diferença, estatisticamente significativa, entre os níveis de RANTES nos locais estudados, ocorreu na placenta de gestantes com SPE em relação aos níveis placentários de gestantes normais, consoante com estudos prévios de que a PE é originada na placenta, a qual libera fatores citotóxicos na circulação materna promovendo disfunção endotelial e a manifestação clínica da síndrome (Redman,

1991; Dekker e Sibai, 1998; Redman et al, 1999; Borzychowski et al, 2006; Mutter e Karumanchi, 2008).

O RANTES é considerado a quimiocina inflamatória mais altamente induzível nas células trofoblásticas por Nakada e colaboradores (2009). A limitada invasão endovascular citotrofoblástica nas artérias uterinas espiraladas e a disfunção celular endotelial são duas condições fundamentais na patogênese da PE, ainda que sua etiologia permaneça desconhecida e os mecanismos responsáveis pela patogênese pouco compreendidos (Dekker e Sibai, 1998; Xia e Kellems, 2009). A baixa invasão trofoblástica nas artérias espiraladas uterinas está fortemente associada às principais linhagens celulares mais influenciadas pela quimiotaxia e ativação de RANTES, as quais são predominantes na decídua no início da gestação. Esse conjunto de fatores pode levar à limitada placentação resultando em hipóxia placentária e liberação de fatores citotóxicos, citocinas e quimiocinas que promovem dano nas células endoteliais maternas com promoção de disfunção endotelial (Dekker e Sibai, 1998; Mutter e Karumanchi, 2008; Sharma et al, 2010); responsável pelas manifestações clínicas como hipertensão arterial sistêmica e proteinúria (Dekker e Sibai, 1998; Borzychowski et al, 2006; Mutter e Karumanchi, 2008; Williams et al, 2009; Sharma et al, 2010).

Apesar da limitada placentação ser responsável pela PE precoce, nem todos os casos de PE estão associados a esse fato (Dekker e Sibai, 1998; Redman et al, 1999; Sharma et al, 2010). Inflamação crônica encontrada em outras doenças como hipertensão e diabetes também promove disfunção endotelial contribuindo para o desenvolvimento de PE por estresse oxidativo da placenta pela presença de radicais livres gerados nestas patologias inflamatórias, as quais estão associadas à PE tardia. Estresse oxidativo e excessiva liberação de sFlt-1 pelo sinciotrofoblasto, sob

hipóxia placentária, podem estar envolvidos na etiologia da PE segundo alguns autores (Mutter e Karumanchi, 2008; Redman e Sargent, 2009).

Estudos como os de O'Brien e colaboradores (2003) e de Mostello e colaboradores (2008) relataram uma associação positiva entre o risco de PE e o aumento do IMC durante a gestação, sendo o sobrepeso e a obesidade prévia à gestação importantes fatores de risco à PE (Walsh, 2007; Ovesen et al, 2011). Apesar de ambos, obesidade e PE, estarem associados com marcadores inflamatórios aumentados como PCR, TNF- α , IL-6, e IL-8 (Walsh, 2007), no presente estudo o IMC não teve nenhuma correlação significativa com os níveis de RANTES nas 69 gestantes estudadas, ao contrário dos estudos de O'Brien e colaboradores (2003) e de Mostello e colaboradores (2008).

A expressão materna de RANTES no plasma e na placenta de gestantes com PE no presente trabalho poderia ser explicada por diversas moléculas inflamatórias envolvidas na sua expressão genética, síntese e liberação. Benyo e colaboradores (2001) demonstraram que a placenta humana, sob condições reduzidas de oxigênio apresenta elevada produção de TNF- α e IL-1 β , já os níveis circulantes de TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão aumentados em mulheres com PE. Além disso, há entendimento de que as citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β podem produzir disfunção endotelial (Benyo et al, 2001). Marfaing-Koka e colaboradores mostraram cultura de células endoteliais produtoras de RANTES ao estímulo de citocinas inflamatórias como TNF- α e IFN- γ , principalmente por aumentar a quantidade de RANTES mRNA celular. Vale lembrar o fato de que as células NK, altamente envolvidas no processo de implantação, sob estímulo de IL-2, induzem a forte produção de IFN- γ e TNF- α , ambas moléculas envolvidas na síntese e liberação de RANTES (Von Rango et al, 2001; Terme, 2005). Além disso, Scaife e

colaboradores (2006) demonstraram que os linfócitos CD8⁺ na decídua, no início da gestação normal, são capazes de função citolítica e representam uma fonte potencial de IFN- γ que poderia afetar a invasão trofoblástica, sendo estes linfócitos as principais células recrutadas por RANTES.

Chun Li e colaboradores (2009) demonstraram em um experimento dose-resposta, que a expressão de RANTES e a sua atividade quimiotática para monócitos aumentaram após estímulo de IL-1 β em células do estroma endometrial.

Ao contrário dos resultados do presente estudo, Jonsson e colaboradores (2006) não encontraram diferenças nos níveis séricos de RANTES entre gestantes normais e gestantes com PE. Os autores dosaram um espectro de citocinas por sistema múltiplo no soro, enquanto que a presente investigação avaliou RANTES pelo método ELISA em plasma. No presente trabalho, apesar das gestantes com SPE apresentarem idade gestacional diminuída em relação a gestantes normais, não houve influência nos valores de RANTES, fato que reduz a possibilidade de viés, no estudo de Jonsson e colaboradores (2006) não houve esta diferença.

Athayde e colaboradores (1999) demonstraram que a concentração de RANTES no fluido amniótico diminui com o avanço da idade gestacional. No presente estudo, verificou-se que a correlação dependente dos níveis de RANTES, tanto placentário quanto plasmático, e a idade gestacional na PE e gestação normal foi perdida quando o ajuste por regressão linear múltipla por classes foi aplicado.

Os níveis de RANTES no cordão umbilical são controversos, pois enquanto Matoba e colaboradores (2009) relataram que os níveis de RANTES no cordão umbilical não estão associados à idade gestacional, Dammann e colaboradores (2001) mostraram níveis elevados de RANTES no cordão umbilical em idade

gestacional baixa. Os níveis de RANTES encontrados no cordão umbilical dos RN de gestantes com SPE no presente estudo estão em sintonia com os achados de Takahashi e colaboradores (2010). Os autores demonstraram uma forte correlação entre as citocinas com perfil Th1 e relataram uma diminuição da expressão Th1 nesse tecido. Hariharan e colaboradores (2000) também mostraram produção diminuída de RANTES em mononucleares do cordão umbilical de RN comparado com mononucleares do sangue periférico de adultos.

Intrigante foi o resultado aumentado de RANTES encontrado no cordão umbilical dos RN de gestantes normais comparado com o plasma de ambas as gestantes, normais e com síndrome de pré-eclâmpsia, pois além das citocinas no cordão umbilical carecerem de um maior número de publicações, RANTES é menos explorado ainda. Os resultados mostraram também a condição inflamatória no cordão umbilical de gestantes. Os resultados encontrados pelo presente trabalho mostram um comportamento distinto anti-inflamatório na SPE, e inflamatório na gestação normal para a quimiocina no cordão umbilical dos RN de ambas as condições. A correlação negativa de RANTES encontrada neste estudo entre as amostras maternas e dos RN mostra um perfil inflamatório oposto na placenta e plasma materno em relação ao plasma do cordão umbilical. Corroborando com nossos resultados, Takahashi e colaboradores (2010) relataram níveis de IL-1 β e IFN- γ , dentre outras citocinas pró-inflamatórias, diminuídos no cordão umbilical (Takahashi et al, 2010).

IL-1 β e IFN- γ têm sido envolvidas na expressão, produção e liberação de RANTES numa ampla variedade de tecidos (Marfaing-Koka et al, 1995; Benyo et al, 2001; Chun-Li F, 2009; Takahash et al, 2010). As citocinas Th1 estão em níveis relativamente baixos comparado com outros tipos de citocinas no cordão umbilical

(Takahashi et al, 2010). Hariharan e colaboradores relataram uma menor produção de RANTES nas células mononucleares do cordão umbilical comparado com as células mononucleares do sangue periférico de adultos (Hariharan et al, 2000).

Os resultados apresentados mostraram concentrações de RANTES elevadas no plasma do cordão umbilical de RN de gestantes normais comparadas com as gestantes com SPE, sugerindo que a gravidez por si mesma apresente-se como uma condição inflamatória também para o feto. Observou-se na SPE um perfil inflamatório diminuído através da quimiocina RANTES, sugerindo um comportamento fetal diferente da gestação normal, talvez com o propósito de evitar a participação de mais fatores adversos que levassem à interrupção precoce da gestação.

O presente trabalho investigou mediadores desta síndrome inflamatória. Critérios de exclusão rígidos foram adotados rejeitando pacientes com qualquer patologia associada. De fato, condições associadas com maior risco de PE, como diabetes, doença renal e outras podem constituir uma limitação do presente estudo. Por outro lado apresenta resultados que parecem ser relevantes especificamente para este distúrbio hipertensivo. A diferença nas idades gestacionais entre SPE e gestação normal pode ser considerada como maior fonte de viés, apesar de que a correlação associando ambas as variáveis foi perdida quando ajustada para classe. A importância deste estudo é o fornecimento de informações novas, investigando RANTES simultaneamente no tecido placentário, plasmáticas materno e do cordão umbilical, estabelecendo o perfil desta citocina na PE e gestação normal.

7 CONCLUSÃO

Os níveis de RANTES na placenta e no plasma de gestantes com SPE foram significativamente maiores quando comparado com gestantes normais.

Os níveis de RANTES no plasma do cordão umbilical de RN de gestantes com PE foram significativamente menores quando comparados com RN de gestantes normais.

Houve uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre a concentração de RANTES na placenta e no plasma materno.

Houve uma correlação negativa, estatisticamente significativa, entre as amostras maternas (plasma e placenta) e o plasma do cordão umbilical.

Este estudo mostrou, pela primeira vez, o perfil de RANTES analisado de maneira simultânea na placenta e plasmas materno e do cordão umbilical, evidenciando diferenças entre suas concentrações entre os grupos de gestantes com e sem SPE.

Os resultados encontrados nas amostras maternas apoiam a ideia de PE ser uma manifestação Th1.

Os resultados de RANTES no plasma do cordão umbilical de RN de gestantes com PE indicam uma atividade menos inflamatória comparados com RN de gestantes normais e mostram uma correlação inversamente proporcional aos níveis de RANTES nas amostra maternas, em ambas as condições.

Os níveis de RANTES neste estudo não sofreram influência do IMC das gestantes e da idade gestacional obstétrica.

8 REFERÊNCIAS

ACOG Practice Bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol*, v. 99, n. 1, p. 159-67, Jan 2002.

ACOG Practice Bulletin No. 125: Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol*, v. 119, n. 2 Pt 1, p. 396-407, Feb 2012.

ADAMS, D. H.; LLOYD, A. R. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*, v. 349, n. 9050, p. 490-5, Feb 1997.

AKINKUGKE A GN, K. S. The hypertensive disorders of pregnancy 1987. Report of a WHO Study Group. World Health Organization. 1987.

APPAY, V. et al. Aggregation of RANTES is responsible for its inflammatory properties. Characterization of nonaggregating, noninflammatory RANTES mutants. *J Biol Chem*, v. 274, n. 39, p. 27505-12, Sep 1999.

APPAY, V.; ROWLAND-JONES, S. L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol*, v. 22, n. 2, p. 83-7, Feb 2001.

ASSEMBLY, U. N. G. United Nations Millennium Declaration A/RES/55/2. UN General Assembly. 55 th session. 2000.

ATHAYDE, N. et al. A role for the novel cytokine RANTES in pregnancy and parturition. *Am J Obstet Gynecol*, v. 181, n. 4, p. 989-94, Oct 1999.

BACON, K. B. et al. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science*, v. 269, n. 5231, p. 1727-30, Sep 1995.

BAKER, P. N. et al. Plasma of preeclamptic women stimulates and then inhibits endothelial prostacyclin. *Hypertension*, v. 27, n. 1, p. 56-61, Jan 1996.

BARD, F.; MALHOTRA, V. The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 22, p. 439-55, 2006.

BECKNELL, B.; CALIGIURI, M. A. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol*, v. 86, p. 209-39, 2005.

BENYO, D. F. et al. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 6, p. 2505-12, Jun 2001.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, v. 7, p. 625-55, 1989.

BEUTLER, B. et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, v. 316, n. 6028, p. 552-4, 1985 Aug 8-14 1985.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, v. 111, n. 2 Suppl, p. S460-75, Feb 2003.

BORZYCHOWSKI, A. M.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*, v. 11, n. 5, p. 309-16, Oct 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, May 1976.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*, v. 214, n. 2, p. 149-60, Jan 2008.

BROSENS, I.; DIXON, H. G.; ROBERTSON, W. B. Fetal growth retardation and the arteries of the placental bed. *Br J Obstet Gynaecol*, v. 84, n. 9, p. 656-63, Sep 1977.

BROWN, M. A. et al. The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: full consensus statement. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, v. 40, n. 2, p. 139-55, May 2000.

BULMER, J. N. et al. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod*, v. 6, n. 6, p. 791-8, Jul 1991.

CARTER, L. L.; SWAIN, S. L. Single cell analyses of cytokine production. *Curr Opin Immunol*, v. 9, n. 2, p. 177-82, Apr 1997.

CERRETTI, D. P. et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, v. 256, n. 5053, p. 97-100, Apr 1992.

CETIN, I. et al. Pregenesys pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies? *Placenta*, v. 32 Suppl, p. S4-16, Feb 2011.

CHESLEY, L. C. Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis. *Kidney Int*, v. 18, n. 2, p. 234-40, Aug 1980.

CHESLEY, L. C. et al. VASCULAR REACTIVITY TO ANGIOTENSIN II AND NOREPINEPHRINE IN PREGNANT WOMEN. *Am J Obstet Gynecol*, v. 91, p. 837-42, Mar 1965.

CHIHARA, J. et al. Elevation of the plasma level of RANTES during asthma attacks. *J Allergy Clin Immunol*, v. 100, n. 6 Pt 2, p. S52-5, Dec 1997.

CHUN-LI F, S.-P. H., SHI-LONG F, WEI W, NA K, XIU-LI W. Ectopic, autologous eutopic and normal endometrial stromal cells have altered expression and chemotactic activity of RANTES. *Europ J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v. 143, p. 55-60, 2009.

COMPARI A B, P. D. F. C. E., PAULA L G. Pré-eclâmpsia: diagnóstico e tratamento. *Acta Médica*, v. 22, p. 293-309, 2001.

CROY, B. A. et al. Uterine natural killer cells insight into their cellular and molecular biology from mouse modeling. *Reproduction*, v. 126, p. 149-60, Ago 2003.

DAMMANN, O. et al. Mediators of fetal inflammation in extremely low gestational age newborns. *Cytokine*, v. 13, n. 4, p. 234-9, Feb 2001.

DAVEY, D. A.; MACGILLIVRAY, I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, v. 158, n. 4, p. 892-8, Apr 1988.

DEKKER, G.; ROBILLARD, P. Y. The birth interval hypothesis-does it really indicate the end of the primipaternity hypothesis. *J Reprod Immunol*, v. 59, n. 2, p. 245-51, Aug 2003.

DEKKER, G. A.; SIBAI, B. M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol*, v. 179, n. 5, p. 1359-75, Nov 1998.

DEVERGNE, O. et al. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. *J Exp Med*, v. 179, n. 5, p. 1689-94, May 1994.

DEVIN, A. et al. The alpha and beta subunits of I κ B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol*, v. 21, n. 12, p. 3986-94, Jun 2001.

DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med*, v. 328, n. 2, p. 106-13, Jan 1993.

DULAY, L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in Perinatology*, v. 33, p. 130-137, 2009.

EBNET, K. et al. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol*, v. 14, p. 155-77, 1996.

EINARSSON, J. I.; SANGI-HAGHPEYKAR, H.; GARDNER, M. O. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, v. 188, n. 5, p. 1241-3, May 2003.

FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, v. 11, p. 571-611, 1993.

FEINMAN, R. et al. Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J Immunol*, v. 138, n. 2, p. 635-40, Jan 1987.

FRIEDMAN, S. A. et al. Preeclampsia and related disorders. Clinical aspects and relevance of endothelin and nitric oxide. *Clin Perinatol*, v. 22, n. 2, p. 343-55, Jun 1995.

GABER, L. W. SPARGO, B. H.; LINDHEIMER, M. D. Renal pathology in pre-eclampsia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, v. 8, n. 2, p. 443-68, Jun 1994.

GAIO, D. S. et al. Hypertensive disorders in pregnancy: Frequency and associated factors in a Cohort of Brazilian women. *Hypertension in Pregnancy*, v. 20, n.3, p. 269-281, Nov. 2001.

GANT, N. F. et al. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest*, v. 52, n. 11, p. 2682-9, Nov 1973.

GAO, J. L. et al. Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J Exp Med*, v. 177, n. 5, p. 1421-7, May 1993.

GIFFORD JR, R. W. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, v. 183, n. 1, p. S1-S22, Jul 2000.

GONZALO, J. A. et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest*, v. 98, n. 10, p. 2332-45, Nov 1996.

HAIDER, S.; KNÖFLER, M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta*, v. 30, n. 2, p. 111-23, Feb 2009.

HARIHARAN, D. et al. C-C chemokine profile of cord blood mononuclear cells: selective defect in RANTES production. *Blood*, v. 95, n. 2, p. 715-8, Jan 2000.

HARLOW, F. H.; BROWN, M. A. The diversity of diagnoses of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, v. 20, n. 1, p. 57-67, 2001.

HEEGER, P. et al. Isolation and characterization of cDNA from renal tubular epithelium encoding murine Rantes. *Kidney Int*, v. 41, n. 1, p. 220-5, Jan 1992.

HELEWA, M. E. et al. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 1. Definitions, evaluation and classification of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ*, v. 157, n. 6, p. 715-25, Sep 1997.

HOGAN, M. C. et al. Maternal mortality for 181 countries, 1980-2008: a systematic analysis of progress towards Millennium Development Goal 5. *Lancet*, v. 375, n. 9726, p. 1609-23, May 2010.

HORNUNG, D. et al. Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stromal cells and peritoneal fluid. *Mol Hum Reprod*, v. 7, n. 2, p. 163-8, Feb 2001.

HU, W. et al. Elevated serum levels of interleukin-15 and interleukin-16 in preeclampsia. *J Reprod Immunol*, v. 73, n. 2, p. 166-71, Apr 2007.

HUO, Y. et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med*, v. 9, n. 1, p. 61-7, Jan 2003.

HWANG, J. H. et al. Cytokine expression in placenta-derived mesenchymal stem cells in patients with pre-eclampsia and normal pregnancies. *Cytokine*, v. 49, n. 1, p. 95-101, Jan 2010.

JANG, G. C. et al. Raised serum interleukin 15 levels in Kawasaki disease. *Ann Rheum Dis*, v. 62, n. 3, p. 264-6, Mar 2003.

JOKIC, M. et al. Fetal distress increases interleukin-6 and interleukin-8 and decreases tumour necrosis factor-alpha cord blood levels in noninfected full-term neonates. *BJOG*, v. 107, n. 3, p. 420-5, Mar 2000.

JONSSON, Y. et al. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol*, v. 70, n. 1-2, p. 83-91, Jun 2006.

KALU, E. et al. Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res*, v. 33, n. 4, p. 490-5, Aug 2007.

KAMIJO, R. et al. Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon gamma receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, n. 14, p. 6626-30, Jul 1993.

KARAKI, M. et al. Expression of interleukin-16 in allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 138, n. 1, p. 67-72, Sep 2005.

KENDALL, R. L.; WANG, G.; THOMAS, K. A. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 226, n. 2, p. 324-8, Sep 1996.

KHAN, K. S. et al. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*, v. 367, n. 9516, p. 1066-74, Apr 2006.

KINCAID-SMITH, P. The renal lesion of preeclampsia revisited. *Am J Kidney Dis*, v. 17, n. 2, p. 144-8, Feb 1991.

KING, A.; LOKE, Y. W.; CHAOUAT, G. NK cells and reproduction. *Immunol Today*, v. 18, n. 2, p. 64-6, Feb 1997.

-
- KITAI, R. et al. Role of MIP-1beta and RANTES in HIV-1 infection of microglia: inhibition of infection and induction by IFNbeta. *J Neuroimmunol*, v. 110, n. 1-2, p. 230-9, Oct 2000.
- KITAMOTO, Y. et al. Glomerular endothelial cells are maintained by vascular endothelial growth factor in the adult kidney. *Tohoku J Exp Med*, v. 195, n. 1, p. 43-54, Sep 2001.
- KOÇYIGIT, Y. et al. Changes in serum levels of leptin, cytokines and lipoprotein in pre-eclamptic and normotensive pregnant women. *Gynecol Endocrinol*, v. 19, n. 5, p. 267-73, Nov 2004.
- KUPFERMINC, M. J. et al. Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, v. 170, n. 6, p. 1752-7; discussion 1757-9, Jun 1994.
- LIEU, Z. Z. et al. A trans-Golgi network golgin is required for the regulated secretion of TNF in activated macrophages in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 9, p. 3351-6, Mar 2008.
- LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol*, v. 145, n. 12, p. 4306-10, Dec 1990.
- LIU, C. H.; HWANG, S. M. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine*, v. 32, n. 6, p. 270-9, Dec 2005.
- LODOLCE, J. et al. Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis. *Mol Immunol*, v. 39, n. 9, p. 537-44, Dec 2002.
- LU, M. M. et al. Increased serum RANTES in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*, v. 32, n. 5, p. 1231-3, May 2012.
- LYNCH, E. A. et al. Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5. *J Immunol*, v. 171, n. 10, p. 4965-8, Nov 2003.
- MALAMITSI-PUCHNER, A. et al. The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early Hum Dev*, v. 81, n. 4, p. 387-92, Apr 2005.
-

MARCELLA, R. et al. Transcription and translation of the chemokines RANTES and MCP-1 in nasal polyps and mucosa in allergic and non-allergic rhinopathies. *Immunol Lett*, v. 90, n. 2-3, p. 71-5, Dec 2003.

MARFAING-KOKA, A. et al. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J Immunol*, v. 154, n. 4, p. 1870-8, Feb 1995.

MATHY, N. L. et al. Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Immunology*, v. 100, n. 1, p. 63-9, May 2000.

MATOBA, N. et al. Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics*, v. 123, n. 5, p. 1320-8, May 2009.

MAYNARD, S. E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, v. 111, n. 5, p. 649-58, Mar 2003.

MBEMBA, E. et al. Glycans are involved in RANTES binding to CCR5 positive as well as to CCR5 negative cells. *Biochim Biophys Acta*, v. 1510, n. 1-2, p. 354-66, Feb 2001.

MEEKINS, J. W. et al. Endothelial cell activation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and the development of pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*, v. 98, n. 1, p. 110-4, Oct 1994.

MEIRI, H.; HUPPERTZ, B.; CETIN, I. Development of early non-invasive markers and means for the diagnosis and progression monitoring of preeclampsia and tailoring putative therapies (project pregenesys 037244). *Placenta*, v. 32 Suppl, p. S1-3, Feb 2011.

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*, v. 2, n. 9, p. 656-63, Sep 2002.

MORETTA, L.; MORETTA, A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J*, v. 23, n. 2, p. 255-9, Jan 2004.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, v. 136, n. 7, p. 2348-57, Apr 1986.

MOSTELLO, D. et al. Recurrence of preeclampsia: effects of gestational age at delivery of the first pregnancy, body mass index, paternity, and interval between births. *Am J Obstet Gynecol*, v. 199, n. 1, p. 55.e1-7, Jul 2008.

MUTTER, W. P.; KARUMANCHI, S. A. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res*, v. 75, n. 1, p. 1-8, Jan 2008.

NAKADA, E. et al. Toll-like receptor-3 stimulation upregulates sFLT-1 production by trophoblast cells. *Placenta*, v. 30, n. 9, p. 774-9, Sep 2009.

NEOTE, K. et al. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell*, v. 72, n. 3, p. 415-25, Feb 1993.

NEVO, O. et al. Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 291, n. 4, p. R1085-93, Oct 2006.

O'BRIEN, T. E.; RAY, J. G.; CHAN, W. S. Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. *Epidemiology*, v. 14, n. 3, p. 368-74, May 2003.

ODEGÅRD, R. A. et al. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *BJOG*, v. 107, n. 11, p. 1410-6, Nov 2000.

OTUN, H. A. et al. Inhibition of first trimester human extravillous trophoblast invasion by TNF and IFNG. *Placenta*, v. 24, p. A67, 2003.

OVESEN, P.; RASMUSSEN, S.; KESMODEL, U. Effect of prepregnancy maternal overweight and obesity on pregnancy outcome. *Obstet Gynecol*, v. 118, n. 2 Pt 1, p. 305-12, Aug 2011.

PATTISON, J. et al. RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney. *Lancet*, v. 343, n. 8891, p. 209-11, Jan 1994.

PINSONNEAULT, S. et al. IL-16 inhibits IL-5 production by antigen-stimulated T cells in atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, v. 107, n. 3, p. 477-82, Mar 2001.

PROUDFOOT, A. E. et al. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem*, v. 276, n. 14, p. 10620-6, Apr 2001.

PROUDFFOT, A. E. et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 4, p. 1885-90, Feb 2003.

PIJNENBORG, R. The placental bed. *Hypertens Pregnancy*, v. 15, p. 7-23, 1996.

RATHANASWAMI, P. et al. Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*, v. 268, n. 8, p. 5834-9, Mar 1993.

REDMAN, C. W. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta*, v. 12, n. 4, p. 301-8, 1991 Jul-Aug 1991.

REDMAN, C. W. Preeclampsia: a multi-stress disorder. *Rev Med Interne*, v. 32 Suppl 1, p. S41-4, Jun 2011.

REDMAN, C. W.; SACKS, G. P.; SARGENT, I. L. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, v. 180, n. 2 Pt 1, p. 499-506, Feb 1999.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*, v. 30 Suppl A, p. S38-42, Mar 2009.

REK, A. et al. A biophysical insight into the RANTES-glycosaminoglycan interaction. *Biochim Biophys Acta*, v. 1794, n. 4, p. 577-82, Apr 2009.

ROBERTS, J. M. et al. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*, v. 161, n. 5, p. 1200-4, Nov 1989.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Immunology*. 4th ed. London: Churchill Livingstone; 1996. p. 14.1-14.9.

ROLLINS, B. J. Chemokines. *Blood*, v. 90, n. 3, p. 909-28, Aug 1997.

ROTH, S. J. et al. Characterization of transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *J Immunol Methods*, v. 188, n. 1, p. 97-116, Dec 1995.

SAAD-EL-DIN BESSA, S.; ABO EL-MAGD, G. H.; MABROUK, M. M. Serum chemokines RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 in Egyptian patients with atopic asthma: relationship to disease severity. *Arch Med Res*, v. 43, n. 1, p. 36-41, Jan 2012.

SCAIFE, P. J. et al. Effector activity of decidual CD8+ T lymphocytes in early human pregnancy. *Biol Reprod*, v. 75, n. 4, p. 562-7, Oct 2006.

SCHALL, T. J. et al. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, v. 347, n. 6294, p. 669-71, Oct 1990.

SCHALL, T. J. et al. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol*, v. 141, n. 3, p. 1018-25, Aug 1988.

SCHIFF, E. et al. Tumor necrosis factor-alpha in pregnancies associated with preeclampsia or small-for-gestational-age newborns. *Am J Obstet Gynecol*, v. 170, n. 5 Pt 1, p. 1224-9, May 1994.

SCHOBEL, H. P. et al. Preeclampsia -- a state of sympathetic overactivity. *N Engl J Med*, v. 335, n. 20, p. 1480-5, Nov 1996.

SEEGERT, D.; SCHREIBER, S. Overview: interleukin-16 and its role in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Investig Drugs*, v. 3, n. 4, p. 562-4, Apr 2002.

SHARMA, A. P.; FILLER, G. Epidemiology of pediatric urolithiasis. *Indian J Urol*, v. 26, n. 4, p. 516-22, Oct 2010.

SHARMA, S.; NORRIS, W. E.; KALKUNTE, S. Beyond the threshold: an etiological bridge between hypoxia and immunity in preeclampsia. *J Reprod Immunol*, v. 85, n. 1, p. 112-6, May 2010.

SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. *Lancet*, v. 365, n. 9461, p. 785-99, 2005 Feb 26-Mar 4 2005.

SIMEONI, E. et al. Association of RANTES G-403A gene polymorphism with increased risk of coronary arteriosclerosis. *Eur Heart J*, v. 25, n. 16, p. 1438-46, Aug 2004.

SIMS, J. E. et al. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, n. 13, p. 6155-9, Jul 1993.

SMITH, C. A.; FARRAH, T.; GOODWIN, R. G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, v. 76, n. 6, p. 959-62, Mar 1994.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSAO E SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Apresentação: Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI. J. Bras. Nefrol. [online]. 2010, vol.32, suppl.1.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, v. 76, n. 2, p. 301-14, Jan 1994.

STARKEY, P. M. The decidua and factors controlling placentation. In: Redman CWG, Sargent LI, Starkey PM, editors. *The human placenta*. Oxford (United Kingdom): Blackwell Scientific Publications, 1993. p. 362-413.

STEEGERS, E. A. et al. Pre-eclampsia. *Lancet*, v. 376, n. 9741, p. 631-44, Aug 2010.

STOW, J. L. et al. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology*, v. 214, n. 7, p. 601-12, Jul 2009.

STREVENS H. et al. Glomerular endotheliosis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG*, v.110, n.9, pg.831-6, Set 2003.

SUGIMOTO, H. et al. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem*, v. 278, n. 15, p. 12605-8, Apr 2003.

TAKAHASHI, N. et al. Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine*, v. 49, n. 3, p. 331-7, Mar 2010.

TAUB, D. D. et al. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol*, v. 59, n. 1, p. 81-9, Jan 1996.

TERME M, M. C., TAIEB J, BORG C, MARUYAMA K, WAKASUGI H, ZITVOGEL L. The dialogue between natural killer cells and dendritic cells. *International Congress Series*, v. 1285, p. 169-176, 2005.

TSUKIMORI, K. et al. The superoxide generation of neutrophils in normal and preeclamptic pregnancies. *Obstet Gynecol*, v. 81, n. 4, p. 536-40, Apr 1993.

VALENTE, A. J. et al. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture. *Biochemistry*, v. 27, n. 11, p. 4162-8, May 1988.

VAN DER MEER, A. et al. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. *Mol. Hum. Reprod.* P. 189-95, 2004.

VEILLARD, N. R. et al. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res*, v. 94, n. 2, p. 253-61, Feb 2004.

VINCE, G. S. et al. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, v. 102, n. 1, p. 20-5, Jan 1995.

VON HUNDELSHAUSEN, P. et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*, v. 103, n. 13, p. 1772-7, Apr 2001.

VON LUETTICHAU, I. et al. RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues. *Cytokine*, v. 8, n. 1, p. 89-98, Jan 1996.

VON RANGO, U. et al. Effects of trophoblast invasion on the distribution of leukocytes in uterine and tubal implantation sites. *Fertil Steril*, v. 76, n. 1, p. 116-24, Jul 2001.

WALSH, S. W. Obesity: a risk factor for preeclampsia. *Trends Endocrinol Metab*, v. 18, n. 10, p. 365-70, Dec 2007.

WANG, L.; DU, F.; WANG, X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, v. 133, n. 4, p. 693-703, May 2008.

WIEDERMANN, C. J. et al. Monocyte haptotaxis induced by the RANTES chemokine. *Curr Biol*, v. 3, n. 11, p. 735-9, Nov 1993.

WIKSTRÖM, A. K. et al. Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*, v. 109, n. 6, p. 1368-74, Jun 2007.

WILLIAMS, D. J. et al. Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. *Am J Physiol*, v. 272, n. 2 Pt 2, p. H748-52, Feb 1997.

WILLIAMS, P. J. et al. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol*, v. 82, n. 1, p. 24-31, Oct 2009.

WINGETT, D.; FORCIER, K.; NIELSON, C. P. Glucocorticoid-mediated inhibition of RANTES expression in human T lymphocytes. *FEBS Lett*, v. 398, n. 2-3, p. 308-11, Dec 1996.

World Health Organization 2011. WHO recommendations for Prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. Disponível em: < http://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal_perinatal_health/9789241548335/en/index.html > .

XIA, Y.; KELLEMS, R. E. Is preeclampsia an autoimmune disease? *Clin Immunol*, v. 133, n. 1, p. 1-12, Oct 2009.

XIANG, J. et al. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet*, v. 363, n. 9426, p. 2040-6, Jun 2004.

YANG, Y. et al. Molecular, biochemical, and functional characteristics of tumor necrosis factor-alpha produced by human placental cytotrophoblastic cells. *J Immunol*, v. 150, n. 12, p. 5614-24, Jun 1993.

YELAVARTHI, K. K.; HUNT, J. S. Analysis of p60 and p80 tumor necrosis factor-alpha receptor messenger RNA and protein in human placentas. *Am J Pathol*, v. 143, n. 4, p. 1131-41, Oct 1993.

ZERNECKE, A. et al. Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10. *Blood*, v. 107, n. 11, p. 4240-3, Jun 2006.

ZHANG, R. et al. Etk/Bmx transactivates vascular endothelial growth factor 2 and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to mediate the tumor necrosis factor-induced angiogenic pathway. *J Biol Chem*, v. 278, n. 51, p. 51267-76, Dec 2003.

ANEXOS

ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

2 - Aprovação do Projeto "Citocinas na Pré-eclâmpsia" no CEP da PUCRS.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 0523/07-CEP

Porto Alegre, 14 de maio de 2007.

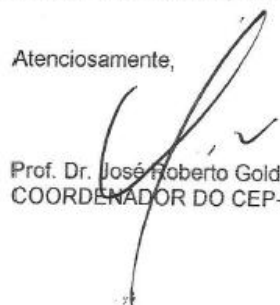
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03460 intitulado:
"Citocinas na pré-eclâmpsia".

Sua investigação está autorizada a partir da
presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser
encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Bartira Ercilia Pinheiro da Costa
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****LINHA DE PESQUISA EM NEFROLOGIA:
ENFOQUE NA GESTAÇÃO E PRESSÃO ARTERIAL**

TCLE aprovado pelo CEP em 31/05/2005 (OF N° 440/05)-CEP e aprovado pelo CONEP registro 11972

Pesquisadores Responsáveis: Bartira Ercila Pinheiro da Costa, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Domingos Otávio L. d'Avila, Ivan Carlos Ferreira Antonello, João Piffero Steibel.

Entrevistador da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da paciente: _____

SOBRE A PESQUISA: A presente linha de pesquisa avalia aspectos da gravidez, como pressão sanguínea e pressão alta na busca do aumento do conhecimento, alívio do sofrimento e melhora da saúde de mulheres e crianças. Esta Linha de Pesquisa é parte do Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina e do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Nos estudos serão avaliados diversos aspectos que podem influenciar na doença, tais como: marcadores presentes no sangue, na urina, na placenta ou em tecidos; função dos vasos sanguíneos; função das células; função de órgãos, como os rins; sensibilidade gustativa ao sal; e fatores genéticos.

A idéia é estudar fatores que possam ser importantes para a ocorrência da doença pré-eclâmpsia, que é a elevação da pressão arterial na gestação com perda de proteína na urina. Estes testes poderão ajudar a diagnosticar as pessoas em risco ou com esta condição, ou eventualmente auxiliar na formulação de novos tratamentos.

O QUE SERÁ FEITO: Você será convidada para uma entrevista com um dos membros da equipe de pesquisa. O pesquisador lhe dirá de que se trata a linha de pesquisa e o estudo que está sendo oferecido. Então será perguntado se deseja participar da pesquisa.

Caso concorde, após assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, serão perguntados dados de sua história médica, coletado um volume de sangue venoso e/ou urina antes e depois do parto, além das coletas dos exames de rotina. Alguns dos estudos desta linha de pesquisa avaliam outros aspectos e também poderá ser coletado amostra de sangue do cordão umbilical após o parto e amostra da placenta, e/ou avaliação da função dos vasos por ecografia, e/ou medida da sensibilidade gustativa ao sal. Em alguns estudos, são avaliados a presença de marcadores genéticos. Os genes a serem estudados são extraídos do sangue ou da placenta, tentando identificar especificamente os possíveis causadores desta doença. Após o parto você poderá ser convidada a realizar acompanhamento clínico com o grupo no ambulatório Nefrologia. Este grupo atende e acompanha pacientes com hipertensão arterial sistêmica, doença hipertensiva da gestação (entre elas pré-eclâmpsia). As mulheres que desenvolvem complicação durante a gestação, têm um maior risco de doenças vasculares no futuro. A idéia do grupo é de acompanhar estas mulheres, a longo prazo, com a finalidade de observar a evolução, detectar fatores de risco ou sinais de doença, encaminhando a prevenção e/ou tratamento destes. Meses após o parto, poderá ser solicitado um exame de cintilografia renal que visa detectar a presença de cicatrizes no rim de mulheres em risco (cicatrizes são mais comuns em mulheres que desenvolveram hipertensão na gestação). Estas avaliações não interferirão nas suas avaliações e cuidados rotineiros.

O material biológico da pesquisa será coletado e congelado até a análise pelos colaboradores do Laboratório de Nefrologia da PUCRS. Os resultados serão publicados em revistas de circulação no meio médico e em congressos.

Para que os estudos possam ser realizados, é necessário que você faça a opção autorizando ou não a coleta dos diferentes materiais ou realização dos exames:

Acompanhamento ambulatorial: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Urina: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Placenta: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sangue: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sangue do Cordão Umbilical: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Ecografia dos vasos: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
 Análise genética: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
 Cintilografia renal: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
 Sensibilidade Gustativa ao Sal: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

*OBS.: Nem todos os testes acima serão necessariamente realizados.

CONFIDENCIALIDADE: Os registros serão mantidos em segredo.

MATERIAL EM ESTUDO E ARMAZENAMENTO: O material poderá ser utilizado apenas para esta pesquisa, ou também ser armazenado para emprego em futuros estudos. É necessário que você faça a opção autorizando ou não o armazenamento para emprego futuro: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Se houver possibilidade de fazermos novas análises com o material coletado, será novamente solicitada a aprovação das Comissões de Ética em Pesquisa para realizar a avaliação adicional. Os estudos são desenvolvidos de forma anônima. Os resultados da pesquisa estarão disponíveis a você em qualquer momento por qualquer motivo. Questionamos se você gostaria de ser comunicada sobre o resultado do estudo. É necessário que você faça a opção escrevendo SIM ou NÃO: _____ QUERO SABER DO RESULTADO DA PESQUISA.

RISCOS E BENEFÍCIOS: Os riscos ou desconfortos dessa pesquisa são considerados mínimos. Este estudo não lhe trará nenhum tipo de discriminação individual ou coletiva. A presente pesquisa se propõe a colaborar com o conhecimento sobre a gestação e suas doenças relacionadas com o controle da pressão arterial, não trazendo benefícios diretos para as pacientes participantes.

LIBERDADE: A sua participação na pesquisa é totalmente voluntária e você pode desistir a qualquer momento, sem prejuízo do tratamento e sem a necessidade de explicar o motivo.

Eu, _____ fui informada pelo(a) _____ dos objetivos e justificativas dessa pesquisa de forma bem clara e detalhada. Recebi informações sobre cada passo que estarei envolvida. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza, e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Estou ciente que as informações por mim fornecidas serão mantidas em segredo e usadas somente conforme opção acima. Fui informada que se existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização, conforme estabelece a lei. Também sei que não terei nenhum custo que seja relacionado à pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este trabalho, posso chamar os pesquisadores pelos seguintes telefones (051) 33367700, 33369599, ou 3320 3000 - Ramais 3174 ou 2344, para qualquer dúvida como participante deste estudo.

Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Sob as condições acima mencionadas, concordo em participar do presente estudo. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovando-o e assinando-o após lê-lo com todo o cuidado possível.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

 Paciente ou Responsável
 CI

 Investigador
 CI/CRM

*EQUIPE PARTICIPANTE: Bartira Costa, Carlos E Poli de Figueiredo, Domingos d'Avila, Ivan Antonello, João Steibel, Giovanni Gadonski, Marta Hentschke, Carolina Mohr, Samantha Diekel, Anna Laura Grings, Christian Drebes, Paula Ternus, Rodrigo F Alves, Rodrigo Pasqua, Augusto Kreling Medeiros, Fernanda Caruso, Lidiane Bernardy, Luciana Cioffi, Luis fernando Spinelli e Thainá Marina..

ANEXO 3 - PROTOCOLO DE ENSAIO DE RANTES

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density.

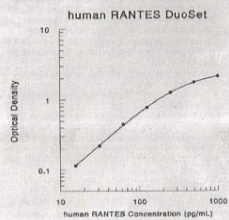
Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the RANTES concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is only for demonstration purposes.

A standard curve should be generated for each set of samples assayed.

The graph below represents typical data generated when using this human RANTES DuoSet. The standard curve was calculated using a computer generated 4-PL curve-fit.



SPECIFICITY

The following factors prepared at 50 ng/mL were assayed and exhibited no cross-reactivity or interference.

Recombinant Human:	Recombinant mouse:
GRGα	MIP-1α
IL-8	MIP-1β
MCP-1	

A sample containing 6250 pg/mL of recombinant mouse RANTES reads as 630 pg/mL (10% cross-reactivity).

CALIBRATION

This DuoSet is calibrated against a highly purified *E. coli*-expressed recombinant human RANTES produced at R&D Systems.

¹If assaying sample types other than cell culture supernates, each laboratory should develop and validate its own diluent. We suggest starting with PBS supplemented with 10, 50% fetal calf serum. The diluent must not be used to dilute the Detection Antibody or the Streptavidin-HRP.

²Individual results may vary due to differences in technique, plasticware and water sources.

³Provided this is within the expiration date of the kit.

⁴Allow all components to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation after initial reconstitution. Working dilutions should be prepared and used immediately.

⁵All buffers containing BSA must be stored at 2-8°C.

⁶Costar FIA Plate (Costar Catalog # 3592 or R&D Systems Catalog # DY990) is suggested. R&D Systems ELISA Plate Sealers (Catalog # DY992) are also available.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

R&D Systems, Inc.
614 McKinley Place NE
Minneapolis, MN 55413
USA
1-800-343-7475
Tel: (612) 378-2956
Fax: (612) 656-4400

R&D Systems Europe, Ltd.
19 Barton Lane
Abingdon Science Park
Abingdon, OX14 3NB
United Kingdom
Tel: +44 (0) 1235 528449
Fax: +44 (0) 1235 533920

750485.10

6/08

DuoSet™ ELISA Development System

Quality | Selection | Performance | Results

human CCL5/RANTES

Catalog Number: DY278

This DuoSet ELISA Development kit contains the basic components required for the development of sandwich ELISAs to measure natural and recombinant human RANTES. DuoSets are designed for the analysis of cell culture supernates. Other sample types, such as serum and plasma, need to be validated prior to use in this DuoSet. Each kit contains sufficient materials to run ELISAs on approximately fifteen 96-well plates, provided that the following conditions are met:¹

- The assay is run as summarized in the General ELISA protocol.
- The recommended microplates, buffers, diluents, substrates, and solutions are used.

This package insert must be read in its entirety before using this product.



www.RnDSystems.com

MATERIALS PROVIDED

Bring all reagents to room temperature before use.

Capture Antibody (Part 840216, 1 vial) - 360 µg/mL of mouse anti-human RANTES when reconstituted with 0.5 mL of PBS. After reconstitution, store at 2-8°C for up to 60 days or aliquot and store at -20°C to -70°C in a manual defrost freezer for up to 6 months.¹ Dilute to a working concentration of 1.0 µg/mL in PBS,² without carrier protein.

Detection Antibody (Part 840217, 1 vial) - 7.2 µg/mL of biotinylated goat anti-human RANTES when reconstituted with 0.5 mL of Reagent Diluent (see Solutions Required section). After reconstitution, store at 2-8°C for up to 60 days or aliquot and store at -20°C to -70°C in a manual defrost freezer for up to 6 months.³ Dilute to a working concentration of 20 ng/mL in Reagent Diluent.⁴

Standard (Part 840218, 1 vial) - 50 ng/mL of recombinant human RANTES when reconstituted with 0.5 mL of Reagent Diluent (see Solutions Required section). Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions. Store reconstituted standard at 2-8°C for up to 60 days or aliquot and store at -70°C for up to 6 months.⁵ A seven point standard curve using 2-fold serial dilutions in Reagent Diluent, and a high standard of 1000 pg/mL, is recommended.

Streptavidin-HRP (Part 890803, 1 vial) - 1.0 mL of streptavidin conjugated to horseradish peroxidase. Store at 2-8°C for up to 6 months after initial use.⁶ **DO NOT FREEZE.** Dilute to the working concentration specified on the vial label using Reagent Diluent (see Solutions Required section).⁷

SOLUTIONS REQUIRED

PBS - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered.

Wash Buffer - 0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2-7.4 (R&D Systems Catalog # WA126).

Reagent Diluent - 1% BSA⁸ in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered (R&D Systems Catalog # DY995).

Quality of BSA is critical (see Technical Hints).

Substrate Solution - 1:1 mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems Catalog # DY999).

Stop Solution - 2 N H₂SO₄ (R&D Systems Catalog # DY994).

Tween is a registered trademark of CI Americas.

GENERAL ELISA PROTOCOL

Plate Preparation

1. Dilute the Capture Antibody to the working concentration in PBS without carrier protein. Immediately coat a 96-well microplate⁹ with 100 µL per well of the diluted Capture Antibody. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate each well and wash with Wash Buffer, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 µL) using a squirt bottle, manifold dispenser or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
3. Block plates by adding 300 µL of Reagent Diluent to each well. Incubate at room temperature for a minimum of 1 hour.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2. The plates are now ready for sample addition.

Assay Procedure

1. Add 100 µL of sample or standards in Reagent Diluent, or an appropriate diluent, per well. Cover with an adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
2. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
3. Add 100 µL of the Detection Antibody, diluted in Reagent Diluent, to each well. Cover with a new adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
5. Add 100 µL of the working dilution of Streptavidin-HRP to each well. Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
6. Repeat the aspiration/wash as in step 2.
7. Add 100 µL of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
8. Add 50 µL of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Determine the optical density of each well immediately, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

TECHNICAL HINTS AND LIMITATIONS

- The use of high quality Bovine Serum Albumin (BSA) for the Reagent Diluent is crucial for the optimum performance of the DuoSet ELISA Development kit. Impurities such as proteases, binding proteins, soluble receptors or other interfering substances can be found to varying degrees in virtually all BSA preparations and can inhibit or interfere with the detection of certain analytes. If the standard curve appears suppressed, consider evaluating a different preparation of BSA.
- We recommend the use of R&D Systems' Reagent Diluent (Catalog # DY995) or the use of Millipore Bovine Serum Albumin, Fraction V, Protease Free (Catalog # 82-045), to prepare your own Reagent Diluent.
- This DuoSet should not be used beyond the expiration date on the label.
- It is important that the diluents selected for reconstitution and for dilution of the standard reflect the environment of the samples being measured. The diluent suggested in this protocol should be suitable for most cell culture supernate samples. Validate diluents for specific sample types prior to use.
- The type of enzyme and substrate and the concentrations of capture/detection antibodies used can be varied to create an immunoassay with a different sensitivity and dynamic range. A basic understanding of immunoassay development is required for the successful use of these reagents in immunoassays.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Wash Buffer should be dispensed forcefully and removed completely from the wells by aspiration or decanting. Remove any remaining Wash Buffer by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
- Use a fresh reagent reservoir and pipette tips for each step.
- It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers. This may interfere with the sensitivity of the assay. Buffers containing a large quantity of protein should be made under sterile conditions and stored at 2-8°C or be prepared fresh daily.

PRECAUTION

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

ANEXO 4 - PROTOCOLO DE COLETA PADRONIZADO

PROTOCOLO DE COLETA PADRONIZADO- LINHA DE PESQUISA HIPERTENSÃO NA GESTAÇÃO
LABORATÓRIO DE NEFROLOGIA/IPB – PUCRS (RAMAL 2344)

IDENTIFICAÇÃO				ANAMNESE				
1	Nome:			Data da última menstruação:			Certeza: <i>Sim Não</i>	1
2	Endereço:			Idade gestacional: DUM=			ECO=	2
3	Cidade:			Nº de gestações:				3
4	Fone:			Nº de partos:				4
5	Data da avaliação:			Nº de abortos:			<i>Provocados Espontâneos</i>	5
6	Registro HSL:			HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA				6
7	Nº do Lab:			Infecção urinária: <i>Não Sim: Infância Fase adulta</i>				7
8	Raça: <i>branca mista negra</i>			HAS: <i>Não Sim: Idade ou IG no diagnóstico:</i>				8
9	Data de nascimento:			PE prévia: <i>Não Sim</i>				9
10	Idade:			DM: <i>Não Sim</i>				10
11	HISTÓRIA FAMILIAR			Outras doenças:				11
12	HAS: <i>Não Sim : Parentesco:</i>			Drogas em uso:				12
13	EXAME LABORATORIAL			EXAMES FÍSICO				13
14	Data:			Data:				14
15	IG: <i>semanas dias</i>			IG: <i>semanas dias</i>				15
16	Hematócrito: %			PAS: mmHg				16
17	Hemoglobina: g/dL			PAD: mmHg				17
18	Leucócitos totais: uL			Peso: kg				18
19	Bastoados: % uL			Altura: cm				19
20	Segmentados: % uL			DADOS DO PARTO				20
21	Basófilos: % uL			Data:				21
22	Eosinófilos: % uL			Hora:				22
23	Monócitos: % uL			Tipo de parto: <i>Normal Cesário Por quê?</i>				23
24	Linfócitos: % uL			DADOS DO RECÉM-NASCIDO				24
25	Plaquetas: mil			Sexo: <i>Masculino Feminino</i>				25
26	Creatinina: mg/100mL Ácido úrico: mg/dL			Apgar: 1º min 5º min				26
27	Proteínúria de amostra: mg/dL			IGO: <i>semanas</i>				27
28	Creatinúria de amostra: mg/dL			Classificação: <i>AIG GIG PIG</i>				28
29	Proteínúria de 24h: mg/24h			Peso: g				29
30	Relação prot/creat: mg/dL			Peso da placenta: g				30
31	Glicemia de jejum: mg/dL			CLASSIFICAÇÃO DA GESTANTE				31
32	Exame qualitativo de urina: pH= dens= prot= +			Controle <i>Hipertensão gestacional Hipertensão crônica</i>				32
33	hem= + leuc= p/c hem= p/c Cél= p/c			<i>Pré-eclâmpsia pura sobreposta Eclâmpsia HELLP</i>				33
34	Outros:			Observação:				34
35								35

ANEXO 5 - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

-----Mensagem original-----

> De: em.ong.0.2c5e19.9f3f25c9@editorialmanager.com

[mailto:em.ong.0.2c5e19.9f3f25c9@editorialmanager.com] Em nome de The Green Journal

> Enviada em: quinta-feira, 12 de julho de 2012 15:43

> Para: Bartira Ercilia P da Costa

> Assunto: Submission Confirmation

>

> Dear Dr. Pinheiro da Costa:

>

> RE: ONG-12-1227

>

> Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Obstetrics & Gynecology. The manuscript has been assigned the number given above. Please refer to this number in any correspondence.

>

> Your manuscript has been assigned to one of the Editors for processing. Please log on to Editorial Manager at <http://ONG.editorialmanager.com> as an AUTHOR for details on your Manuscript titled "RANTES levels in placenta, maternal and umbilical cord plasmas in normal and preeclamptic pregnancy."

>

> If you have not already done so, please submit an author agreement form (available in each issue of the journal and online at <http://ong.edmgr.com>) to the editorial office. Currently, the journal can accept original, electronic, or fax copy signatures.

>

> Best regards,

>

> The Editors of Obstetrics & Gynecology

>

> 2010 IMPACT FACTOR: 4.392

> 2010 IMPACT FACTOR RANKING: 2nd out of 75 ob/gyn journals

> TIMING: 87% of manuscripts published within 6 months

>

ANEXO 6 - ARTIGO**RANTES levels in placenta, maternal and umbilical cord plasmas in normal and preeclamptic pregnancy**

Ilson D da Silveira, PhD; Bruna Krauspenhar; Marta Hentschke, MD; Ivan Carlos Antonello, MD, PhD; Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, MD, PhD; Bartira Ercilia Pinheiro da Costa, BSc, PhD.

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Nefrologia), Faculdade de Medicina/Instituto de Pesquisas Biomédicas/Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Bartira Ercilia Pinheiro da Costa

Address: Av. Ipiranga, 6690. Hospital São Lucas da PUCRS

2° Andar Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas

Porto Alegre, RS, Brazil ZIP code: 90610-000

Telephone: ++ 55 51 33367700

Fax: ++ 55 51 33367700

e-mail: bart@pucrs.br

Support was received from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). CEPF is a CNPq researcher.

Disclosure: None of the authors have a conflict of interest.

Short title: RANTES levels in preeclampsia

Précis –

RANTES levels in preeclampsia have an inflammatory profile in the placenta and maternal plasma, but anti-inflammatory in the umbilical cord plasma.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To estimate RANTES levels at maternal plasma, umbilical cord blood plasma and placenta in preeclampsia and normal pregnancy.

METHODS: A cross-sectional study was conducted to estimate RANTES levels in maternal plasma, placenta and cord blood plasma in preeclampsia compared to a control group of women with normal pregnancy attended at São Lucas Hospital/PUCRS, Porto Alegre, RS Brazil. Concentrations of RANTES were measured using a human RANTES ELISA assay.

RESULTS: Women with preeclampsia showed significantly higher RANTES levels in plasma and placenta in comparison to women with normal pregnancy ($P<0.01$). The cord blood plasma of infants born from women with preeclampsia showed significant decreased RANTES levels compared to infants of normal pregnancy ($P<0.01$). The concentration of placental RANTES was positively correlated with RANTES in the maternal plasma (Pearson's correlation $r= 0.697$; $p<0.001$), and negatively with the cord blood plasma ($r= -0.818$; $p<0.001$). A strong negative correlation was also demonstrated between maternal plasma and cord blood plasma RANTES ($r= -0.751$, $p<0.001$).

CONCLUSION: This study shows a distinct inflammatory response between the mother and the fetus in preeclamptic and normal pregnancies. Preeclamptic maternal plasma and placenta displayed increased pro-inflammatory cytokine concentration, however a reduced inflammatory response was present in the fetal plasma from preeclampsia pregnancies.

INTRODUCTION

Preeclampsia, defined as hypertension accompanied by proteinuria (1), is a pregnancy-specific syndrome that complicates approximately 2-8% of pregnancies, and is one of the major causes of maternal, fetal, and perinatal morbidity and mortality (2,3). Its etiology is still unknown, being characterized by a systemic maternal inflammatory response, including endothelial dysfunction and leukocyte activation (4,5). Chronic hypertension, diabetes, obesity and inflammatory disorders are well known risk factors for preeclampsia (4,6-8).

Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES), or Chemoattractant Chemokine Ligand 5 (CCL5) (9) is a proinflammatory cytokine with chemotactic activity (10,11). It is also a powerful leukocyte activator, induces infiltration to acute or chronic inflamed sites by binding to activated endothelium (12,13).

In preeclampsia, RANTES genes (14) and decidual cells of first trimester (15) are up-regulated. In addition, platelets release larger quantities of RANTES ex-vivo (16), although normal serum levels have been reported (17). We are not aware of any previous study evaluating RANTES in placenta tissue, and plasma from maternal and umbilical cord blood in the same pregnant women. The purpose of current investigation was to determine RANTES concentration at placenta, maternal and cord blood plasmas in preeclampsia compared to normal pregnancy.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

A cross-sectional study was conducted in 69 women with singleton pregnancies that received obstetric care at São Lucas Hospital/Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS): 33 with and 36 without preeclampsia. Preeclampsia syndrome was defined as new hypertension ($>139/89$ mmHg) accompanied by new proteinuria (>0.29 g/24h or $> 0,3$ proteinuria/creatininuria ratio) occurring after 20th gestational weeks as recommended by the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (NHBPEPWGHBPP) (1) and by the Brazilian Hypertension Guidelines (18). Patients with history of diabetes mellitus, renal, liver and infectious diseases, polyhydramnios, multiple gestation or premature rupture of membrane were excluded. Normal pregnant women with urinary protein of at least 1+ in dipstick analysis were not included. Severe preeclampsia was considered if one or more of the following were present: blood pressure $>159/109$ mmHg, excretion of more than 4.9 g in a 24 h urine sample., Hemolysis Elevated Liver Low Platelet (HELLP) syndrome, thrombocytopenia, epigastric or right upper quadrant pain and hemolysis, impaired liver function, pulmonary edema or diagnosis and visual or cerebral disturbance.

The protocol was approved by the Research Ethics Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) and all participants provided informed written consent (document number: 0523/07-CEP).

Sample Collection and RANTES analysis

A maternal blood sample (4 mL in EDTA) was collected a few minutes before delivery. Immediately following delivery, a 4 mL umbilical cord blood was taken in a tube with EDTA. Bloods collected were centrifuged within 1 hour at 3000 g for 10 minutes, and the supernatant were frozen at -80°C until use. After delivery a placental cubes of approximately 1 cm^3 from the maternal side cotyledons localized in half the distance between the umbilical cord and the placental border was dissected. The cubes from preeclamptic and normal pregnant were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS), and stored at -80°C . The placental specimen was analyzed after the following treatment: frozen placental sample was homogenized adding 200 μL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5); 1 mM MgCl_2 ; 1 mM EDTA (0.5 M pH 8.0); 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride 100 mM; 5 mM beta-mercaptoethanol, 0.5% 3[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid; 10% glycerol, bi-distilled water (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA-USA), compressed, diluted in 2 mL of PBS 1X, centrifuged at 4,000 X g for 10 minutes at 5°C ; the supernatant was stored at -80°C . Placental aliquots were analyzed for protein concentration according Bradford method (19).

Concentrations of RANTES were measured using a sandwich ELISA assay (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN-USA.) specific for human, with no known cross-reactivity with others cytokines or chemokines. In order to measure RANTES the validation assay determined dilutions in diluent reagent (as recommend by manufacturer): 128 fold to maternal plasma, 50 fold to placenta and 300 fold to cord blood plasma. Assay linearity range was between 10-1000 pg/mL and the interval intra and inter-assay coefficient of variation were under 12% and 5-10%, respectively.

STATISTICAL ANALYSIS

Continuous data were presented as mean and standard deviation and comparisons between groups used Student's *t* test. Asymmetric data were described using median, minimum and maximum values and were compared using Mann-Whitney *U* test. Categorical data were summarized with absolute and relative frequencies with significance assessed employing chi-square test or Fisher's exact test. Correlations used Pearson or Spearman Correlations. Significance level was set to $\alpha=0.05$. Data were analyzed using SPSS version 17.0 for Windows.

RESULTS

Table 1 summarizes the demographic and clinical characteristics of women and newborns with normal pregnancy and preeclampsia. Maternal age, obstetric gestational age, parity, normal delivery, race, systolic and diastolic blood pressure, maternal weight, glycaemia, body mass index (BMI) (adjusted by gestational age (20), newborn weight, placental weight, Apgar score at 1 and 5 minutes after birth at sampling and, newborn size classification were compared between groups. Gestational age was lower in preeclampsia compared to normal pregnancy. Diastolic and systolic blood pressure were higher in preeclampsia. Newborn weight from preeclamptic women was decreased compared with infants from women normotensive pregnant.

Figure 1 shows that women with preeclampsia had significantly higher plasma (96.7 ± 25.1 ng/dL vs 42.8 ± 17.8 ng/dL) and placental (210.0 ± 85.8 ng/g protein vs 14.2 ± 4.2 ng/g protein) RANTES concentration than women with normal pregnancy ($p < 0.001$). Cord blood plasma of newborn from women with preeclampsia showed decreased RANTES levels compared to control group (21.1 ng/dL [p 25: 11.2 -P 75: 30.1] vs 198.8 ± 24.2 ng/dL; $p < 0.001$).

There were significant correlation between RANTES and obstetric gestational age in the placenta, maternal and cord blood plasma from both, normal and preeclamptic pregnancies (Pearson's $r = -0.378$ $p = 0.01$; Pearson's $r = -0.394$ $p = 0.01$ and Spearman's $\rho = 0.432$ $p < 0.01$ respectively). That correlation was lost when adjusted by multiple linear regression by class (normal and preeclampsia) ($p < 0.14$). RANTES concentration in placenta, maternal, and cord blood plasma were unaffected by BMI.

The concentration of placental RANTES had a positive correlation with RANTES in maternal plasma (Pearson's correlation $r = 0.697$; $p < 0.001$), and negative with the cord blood plasma (Spearman's $\rho = -0.818$; $p < 0.001$). A strong negative correlation was demonstrated between maternal plasma and cord blood plasma RANTES (Spearman's ρ correlation; $r = -0.751$, $p < 0.001$).

DISCUSSION

An important difference in RANTES concentration at placental tissue, maternal plasma and umbilical cord plasma was disclosed between preeclampsia and normotensive controls. That profile suggests an exacerbated maternal and placental inflammatory response in preeclampsia, in accordance with the inflammatory

hypothesis proposed by (Redman, Sacks *et al.*, 1999). The large placental RANTES concentration difference between groups support the idea that in preeclampsia this tissue is a source of cytotoxic factors, releasing substances into the maternal circulation, which promotes endothelial dysfunction and clinical features of the syndrome (4,8,21-23). Similar to RANTES, several inflammatory molecules as tumoral necrosis factor (TNF α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in placenta, as well as maternal circulating levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 are increased in preeclampsia (24). It is possible that those alterations are related, considering that endothelial cells stimulated by TNF- α and interferon γ (IFN- γ) in culture produce RANTES detected by the mRNA synthesis per cell (25). This molecule has been reported as the highest inducible inflammatory chemokine in trophoblast cells (26). Besides endothelial cells and placenta, a dose-response experiment demonstrated that RANTES expression and monocyte chemotactic activity were significantly increased after the stimulation of IL-1 β in endometrial stromal cells (27).

We found the augmented concentration of RANTES maternal plasma in preeclamptic patients. These data are consistent with the inflammatory profile revealed in the placenta, especially considering that this tissue probably deliver substances in maternal plasma, which initiate a cascade of events promoting endothelial dysfunction. In contrast, the findings of Jonsson *et al* (2006) (17) showed no difference between pregnant groups, by using a Multiplex Bead Array in serum – a different assay from we employed in the present work.

There are few studies investigating RANTES in maternal serum/plasma, and we were not able to find any reference examining umbilical cord plasma in preeclampsia. Intriguingly, RANTES levels in cord blood plasma from preeclampsia were lower than in normal pregnant. Considering that umbilical cord RANTES is higher in normal

pregnancy, it may imply that pregnancy *per se* is also an inflammatory condition to the fetus. Reduced fetal plasma RANTES concentration in preeclampsia lead us to suggest an anti-inflammatory behavior, so decreased inflammatory response. This maybe an adaptive fetal response to avoid triggering adverse effects, which could lead to complications and/or pregnancy interruption before term. Nevertheless, data concerning RANTES levels at cord blood and gestational age are controversial. While Matoba et al (2009) (28) reported a positive association; Dammann et al (2001) (29) showed increased quantities in extreme low gestational age. Data from the present study shows that gestational age has no association with RANTES levels, even though the design of this study was not intended to evaluate the issue. Our findings are in agreement that preeclampsia is a Th1 response, and the successful pregnancy is a Th2 phenomenon (22,30). In Lyon's et al review about cytokines in maternal, cord and newborn blood of preterm birth is stated that the levels of proinflammatory cytokines, particularly IL 6, IL-beta1, and TNF-alpha are increased when compared to births at term. However, the authors comment about few studies and results in this issue leading to an inconsistent conclusions (31).

The present work investigates mediators in this inflammatory syndrome. Rigorous exclusion criteria were adopted, rejecting patients with any associated pathologies other than preeclampsia syndrome. In fact, that condition associated with higher risk of preeclampsia, such as diabetes, renal disease and others maybe a limitation of the present study. On the other hand, it presents results that seem to be relevant specifically to this hypertensive disorder. The difference in the gestational ages between preeclampsia and normal pregnancy could also be understood as a source of bias, although correlation linking both variables was lost when adjusted for class. The strength of our study lay in providing novel information, investigating

RANTES levels simultaneously in placenta tissue, maternal and cord blood plasma, establishing RANTES profile in preeclampsia and normal pregnancy. The study demonstrated an inverted inflammatory profile between mother and fetus.

In conclusion, our results demonstrate that RANTES levels have an inflammatory profile in the placenta and maternal plasma, but an anti-inflammatory one in preeclampsia when compared to normal pregnancy.

REFERENCES

1. Gifford RW, August PA, Cunningham G, Green LA, Lindheimer MD, McNellis D. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:S1-S22.
 2. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:80-3.
 3. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009;33:130-7.
 4. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:499-506.
 5. Redman CW. Preeclampsia: a multi-stress disorder. *Rev Med Interne* 2011;32:S41-4.
 6. Sibai BM, Gordon T, Thom E, Caritis SN, Klebanoff M, McNellis D, et al. Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:642-8.
 7. O'Brien TE, Ray JG, Chan WS. Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. *Epidemiology* 2003;14:368-74.
-

-
8. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:309-16.
 9. Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, et al. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 1988;141:1018-25.
 10. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990;347:669-71.
 11. Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med* 1992;176:1489-95.
 12. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* 2001;22:83-7.
 13. Wiedermann CJ, Kowald E, Reinisch N, Kaehler CM, von Luetlichau I, Pattison JM, et al. Monocyte haptotaxis induced by the RANTES chemokine. *Curr Biol* 1993;3:735-9.
 14. Heikkila A, Tuomisto T, Hakkinen SK, Keski-Nisula L, Heinonen S, Yla-Herttuala S. Tumor suppressor and growth regulatory genes are overexpressed in severe early-onset preeclampsia--an array study on case-specific human preeclamptic placental tissue. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:679-89.
 15. Li M, Wu ZM, Yang H, Huang SJ. NFkappaB and JNK/MAPK activation mediates the production of major macrophage- or dendritic cell-recruiting
-

-
- chemokine in human first trimester decidual cells in response to proinflammatory stimuli. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2502-11.
- 16.Mellembakken JR, Solum NO, Ueland T, Videm V, Aukrust P. Increased concentrations of soluble CD40 ligand, RANTES and GRO-alpha in preeclampsia--possible role of platelet activation. *Thromb Haemost* 2001;86:1272-6.
- 17.Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, et al. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol* 2006;70:83-91.
- 18.Poli-de-Figueiredo CE, Tavares A, Freitas EV, Burdmann EdA, Oliveira IL, Magalhães LC, et al. Hipertensão em situações especiais. *J Bras Nefrol* 2010;32:54-9.
- 19.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- 20.Atalah Samur E, Castillo CL, Castro Santoro R, Aldea AP. Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women *Rev Méd Chile* 1997;125:1429-36.
- 21.Redman CW. Immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol* 1991;15:257-62.
- 22.Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1359-75.
- 23.Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res* 2008;75:1-8.
-

-
24. 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.
 25. Marfaing-Koka A, Devergne O, Gorgone G, Portier A, Schall TJ, Galanaud P, et al. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J Immunol* 1995;154:1870-8.
 26. Nakada E, Walley KR, Nakada T, Hu Y, von Dadelszen P, Boyd JH. Toll-like receptor-3 stimulation upregulates sFLT-1 production by trophoblast cells. *Placenta* 2009;30:774-9.
 27. Fang CL, Han SP, Fu SL, Wang W, Kong N, Wang XL. Ectopic, autologous eutopic and normal endometrial stromal cells have altered expression and chemotactic activity of RANTES. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;143:55-60.
 28. Matoba N, Yu Y, Mestan K, Pearson C, Ortiz K, Porta N, et al. Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics* 2009;123:1320-8.
 29. Dammann O, Phillips TM, Allred EN, O'Shea TM, Paneth N, Van Marter LJ, et al. Mediators of fetal inflammation in extremely low gestational age newborns. *Cytokine* 2001;13:234-9.
 30. 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.
-

31. Lyon D, Cheng CY, Howland L, Rattican D, Jallo N, Pickler R, et al. Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: part I associations with preterm birth. *Biol Res Nurs* 2010;11:371-6.

Figure Legend

Preeclamptic (n=33) and normal pregnancy (n=36) RANTES levels in placenta tissue, and plasmas from umbilical cord and mother.

Table 1 – Demographic and clinical data from normal pregnancy and preeclampsia.

	Normal Pregnancy (n=36)	Preeclampsia (n=33)	P
Maternal Age (years)	25.6±5.2	26.3±6.7	0.617*
Obstetric Gestational Age (weeks)	39.5±1.5	36.0±4.5	<0.001*
Primiparity: n (%)	16 (44.4)	23 (69.7)	0.109**
Normal Delivery: n (%)	26 (72.2)	8 (24.2)	<0.001**
Caucasian: n (%)	18 (52.9)	20 (60.6)	0.818**
Systolic Blood Pressure (mmHg)	116.7±10.6	156.6±18.6	<0.001*
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	74.5±7.3	100.8±14.3	<0.001*
Maternal Weight (kg)	76.7±17.6	80.2±15.6	0.411*
Body Mass Index:	29.7±5.3	30.6±4.7	0.480*
Body Mass Index category:			0.768***
Normal Weight: n (%)	13 (37.1)	10 (33.3)	
Discrete Overweight: n (%)	11 (31.4)	10 (33.3)	
Severe Overweight: n (%)	7 (20.0)	4 (13.3)	
Obese: n (%)	4 (11.4)	6 (20.0)	
Glicemia (mg/dL)	76.6±7.4	76.0±10.9	0.812*
Newborn Weight (g)	3,397.4±464.7	2,683.0±1,014.8	<0.001*
Placental Weight (g)	644.1±148.3	575.2±187.9	0.097*
Apgar Index (1 st minute)	8.1±1.7	7.5±1.7	0.152*
Apgar Index (5 th minute)	9.1±1.8	8.8±1.1	0.421*
Newborn classification			0.029****
Appropriate for Gestational Age: n (%)	27 (75.0)	26 (83.9)	
Large for Gestational Age: n (%)	9 (25.0)	2 (6.5)	
Small for Gestational Age: n (%)	0	3 (9.7)	

*t-test; **Qui-square test;***Fischer Exact Probability Test; ****Qui-square test

followed by Fisher's Exact Test

