

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA  
TESE DE DOUTORADO

**Perfil de citocinas (T1 e T2) e distribuição dos subtipos linfocitários  
(CD3/CD4/CD8 e CD26) na gestação com e sem a síndrome de pré-eclâmpsia.**

IARA DOS SANTOS FAGUNDES

Porto Alegre, 2008

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

Perfil de citocinas (T1 e T2) e distribuição dos subtipos linfocitários (CD3/CD4/CD8 e CD26)  
na gestação com e sem a síndrome de pré-eclâmpsia.

**IARA DOS SANTOS FAGUNDES**

PORTO ALEGRE, 2008

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

Perfil de citocinas (T1 e T2) e distribuição dos subtipos linfocitários (CD3/CD4/CD8 e CD26)  
na gestação com e sem a síndrome de pré-eclâmpsia.

**IARA DOS SANTOS FAGUNDES**

**Dissertação para postular título de Doutor sob orientação:**

**Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa**

**Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo**

PORTO ALEGRE, 2008

F156p Fagundes, Iara dos Santos

Perfil de citocinas (T1 e T2) e distribuição dos subtipos linfocitários (CD3/CD4/CD8 e CD26) na gestação com e sem a síndrome de pré-eclâmpsia / Iara dos Santos Fagundes. – Porto Alegre, 2008.  
118 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Nefrologia. PUCRS, 2008.

Orientador: Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa, Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

1. Complicações na Gravidez. 2. Pré-Eclâmpsia. 3. Inflamação.  
I. Título.

CDD : 618.75

**Bibliotecário Responsável**

Ginamara Lima Jacques Pinto  
CRB 10/1204

***Das utopias***

*Se as coisas são inatingíveis... ora!*

*Não é motivo para não querê-las...*

*Que tristes os caminhos, se não fora*

*A mágica presença das estrelas!*

***Mario Quintana***

## **FOMENTO**

**As fontes financiadoras deste trabalho foram:**

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**

**Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**

**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)**

**Ministério da Saúde (MS)**

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)**

# DEDICATÓRIA

Ao meu pai, pelo exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS, em especial aos professores da Nefrologia, pela oportunidade do aprendizado.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores orientadores Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo e Dra. Bartira Ercilia Pinheiro da Costa pelo apoio, confiança, estímulo e exemplo de profissionalismo.

Aos estudantes de Medicina pelo empenho e dedicação na seleção das pacientes.

À professora Dra. Denise Canaterelli Machado pela valiosa contribuição na citometria de fluxo.

À Silvana Lunardi Alves pela solicitude e incansável ajuda. Ao Cristian Viezzer e Jeremiah Lubianca pelo suporte técnico.

Ao professor Dr. Mario Bernardes Wagner pela assessoria estatística.

Ao casal Darci e Ivone Ramos pela amizade, carinho e conforto.

A minha família, em especial à Tati, mais do que irmã, companheira em todos os momentos.

As gestantes participantes do estudo. Num momento tão especial e delicado de suas vidas, grandes colaboradoras desta conquista.

Obrigada !



## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>7</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1. PRÉ-ECLÂMPsia	19
1.1 APRESENTAÇÃO CLÍNICA	19
2. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA GESTAÇÃO NORMAL E COM A SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPsia	21
2.1 INFLAMAÇÃO E GESTAÇÃO NORMAL	21
2.2 INFLAMAÇÃO E PRÉ-ECLÂMPsia	26
3. QUANTIFICAÇÃO DAS CELULAS PRODUTORAS DAS CITOCINAS DO TIPO 1 E DO TIPO 2 POR CITOMETRIA DE FLUXO	30
<b>HIPÓTESE</b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
1. OBJETIVO GERAL:	33
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
1. DEFINIÇÕES PARA O TRABALHO	34
2. DELINEAMENTO	35
3. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	35

4. PACIENTES _____	35
4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO _____	36
4.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO _____	36
4.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO _____	37
4.4. FATORES EM ESTUDO _____	37
4.5 TAMANHO AMOSTRAL _____	37
5. PROCEDIMENTOS TÉCNICO-LABORATORIAIS _____	37
5.1. MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA: _____	37
5.2. PROTOCOLO DE INCLUSÃO NO ESTUDO _____	38
5.3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO _____	39
5.4. ANÁLISES LABORATORIAIS _____	39
6. CITOMETRIA DE FLUXO _____	40
6.1. MARCAÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE CITOCINAS IL-2, IL-10 E IL-4 EM LINFÓCITOS CD4+ _____	42
6.2. MARCAÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DAS CITOCINAS IFN $\gamma$ , IL-10 E IL-4 EM LINFÓCITOS CD3+ _____	45
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	53
8. CONSIDERAÇÕES SOBRE A LOGÍSTICA DO ESTUDO E FORMATO DA TESE _____	54
<b>RESULTADOS _____</b>	<b>57</b>
1. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DOS GRUPOS ESTUDADOS. _____	57
2. DISTRIBUIÇÃO LEUCOCITÁRIA EM SANGUE PERIFÉRICO NOS GRUPOS DE ESTUDO. _____	61
3. DADOS DO PARTO E DO RECÉM-NASCIDO _____	64
<b>DISCUSSAO _____</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSÕES _____</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO 1 _____</b>	<b>93</b>
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO _____	93

**ANEXO 2** \_\_\_\_\_ **96**

PROCOLO DE COLETA PADRONIZADO– LINHA DE PESQUISA HIPERTENSÃO NA GESTAÇÃO **96**

**ANEXO 3** \_\_\_\_\_ **98**

ARTIGO SUBMETIDO AO JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY \_\_\_\_\_ **98**

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIG	Adequado para a idade gestacional
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Céls	Células
céls/µl	Células por microlitro
Citocinas tipo 1	INF $\gamma$ , IL-2
Citocinas tipo 2	IL-4, IL-10
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CR	Creatinina
DHG	Doença Hipertensiva Gestacional
DP	Desvio Padrão
DUM	Data da Última Menstruação
F	Frequência
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul
FITC	Isotiocinato de Fluoresceína
g	Gramas
g/dl	Gramas por decilitro
GIG	Grande para a idade gestacional
GN	Gestante Normal
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematócrito
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelet</i>
HG	Hipertensão Gestacional
HSL	Hospital São Lucas da PUCRS
IG	Idade Gestacional
Ig G	Imunoglobulina G
IGP	Idade Gestacional Pediátrica
IL-	Interleucinas
INF $\gamma$	Interferon gama
kg	Kilograma
L	Litro
LFMN	Linfomononucleares
ml	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
n	Tamanho da amostra
NHBPEPWG	<i>National High Blood Pressure Education Program Working Group</i>
NK	<i>Natural Killer cells</i>
NK1/NK2	Razão de citocinas do tipo 1 e do tipo 2 nas células NK
nm	Nanômetros
P	Significância estatística
P/C	Relação proteinúria e creatininúria em amostra de urina

PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PE	Ficoeritrina
PES	Pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica
PIG	Pequeno para a idade gestacional
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RN	Recém-nascido
Sem	Semana
SPE	Síndrome da Pré-Eclâmpsia
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
t	Teste t de Student
T1	Linfócitos T-CD3+ com fenótipo de citocinas do tipo 1
T1/T2	Razão de citocinas do tipo 1 e do tipo 2 em linfócitos T-CD3+
T2	Linfócitos T-CD3+ com fenótipo de citocinas do tipo 2
Ta	Linfócitos T auxiliares-CD4+
Ta1/Ta2	Razão de citocinas do tipo 1 e do tipo 2 em linfócitos T auxiliares CD4+
Tc	Linfócitos T citotóxicos-CD8+
Tc1/Tc2	Razão de citocinas do tipo 1 e do tipo 2 em linfócitos T citotóxicos-CD8+

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama dos componentes ópticos do citômetro (adaptado de <i>Flow Cytometry Laboratory</i> , 2008).	41
Figura 2. Seleção da população linfocitária de acordo com as características de tamanho e granulosidade após cultura celular.	43
Figura 3. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD4 em linfócitos após a cultura celular.	43
Figura 4. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti-IL-4 em linfócitos após a cultura celular.	43
Figura 5. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti-IL-10 em linfócitos após a cultura celular.	44
Figura 6. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti-IL-2 em linfócitos após a cultura celular.	44
Figura 7. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD3 em linfócitos após a cultura celular.	45
Figura 8 Seleção da população linfocitária de acordo com as características de tamanho e granulosidade após cultura celular.	47
Figura 9. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD3 e anti-IFN $\gamma$ em linfócitos após a cultura celular.	48
Figura 10. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD3 e anti-IL-10 em linfócitos após a cultura celular.	48
Figura 11. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD3 e anti-IL-4 em linfócitos após a cultura celular.	49
Figura 12. Controle isotópico para marcação de fluorescência não-específica (FL1 x FL2)	49
Figura 13. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD3 em linfócitos após a cultura celular.	50
<b>6.3. Determinação do percentual de linfócitos CD3+ e dos subtipos CD4+, CD8+, CD26+ e CD4+/26+</b>	<b>50</b>
Figura 14. Seleção da população linfocitária de sangue periférico de acordo com as características de tamanho e granulosidade.	51
Figura 15. Gráfico em <i>dot plot</i> exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti-CD8 em linfócitos de sangue periférico.	52

- Figura 16. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti-CD26 em linfócitos de sangue periférico. \_\_\_\_\_ 52
- Figura 17. Controle isotípico para marcação de fluorescência não-específica (FL1 x FL2) \_\_\_\_\_ 53
- Figura 18. Gráfico de dispersão de pontos representando a distribuição dos linfócitos CD4+ nos grupos de estudo. \_\_\_\_\_ 63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos grupos Gestação Normal e Síndrome de Pré-Eclâmpsia _	59
Tabela 2. Características clínicas e história médica obstétrica progressa nos grupos Gestação Normal e Síndrome de Pré-Eclâmpsia _____	60
Tabela 3. Leucometria e contagem dos subtipos linfocitários entre os grupos de estudo. _____	62
Tabela 4. Percentual dos linfócitos CD3+ com imunofenótipo de citocinas do tipo 1 e do tipo 2 em sangue periférico nos grupos de estudo. _____	64
Tabela 5. Características do parto e do recém-nascido nos grupos de estudo. _____	65



## RESUMO

A Síndrome da Pré-Eclâmpsia (SPE) é o distúrbio hipertensivo que ocorre na segunda metade da gestação. Os sinais clínicos são parte de uma resposta inflamatória intensa que inclui a ativação leucocitária. O desequilíbrio no balanço de citocinas secretadas pelos linfócitos auxiliares Ta1 (inflamatórias) e Ta2 (antiinflamatórias) a favor do perfil Ta1 dominante é descrito como um marcador da resposta inflamatória sistêmica na SPE. O presente estudo investigou as alterações nas citocinas totais T1/T2 nos linfócitos T CD3<sup>+</sup> e a distribuição dos linfócitos sanguíneos periféricos nas mulheres com pré-eclâmpsia em comparação às gestantes normotensas. Cinquenta e uma mulheres foram incluídas no estudo (SPE=26, Controles=25). A contagem global de leucócitos e a contagem de linfócitos, o percentual de células CD3<sup>+</sup> (linfócitos T imunocompetentes), o percentual das células INF- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> (linfócitos T com imunofenótipo de citocinas do tipo 1), o percentual das células IL-4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> (linfócitos T com imunofenótipo de citocinas do tipo 2), o percentual das células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (linfócitos T auxiliares/T citotóxicos) e o percentual das células CD26<sup>+</sup> (atividade dipeptidil-peptidase IV) foram determinados em amostras de sangue através das análises por citometria de fluxo em 2 cores. Detectou-se que o nível do subtipo linfocitário CD4<sup>+</sup> no grupo SPE foi mais elevado que no grupo controle (43.6 $\pm$ 5.8 vs 37.8 $\pm$ 5.7%; P=0.002). Todos os outros parâmetros imunológicos não foram significativamente diferentes entre os grupos (P>0.05). Concluiu-se que a situação de ativação imunológica, devido ao aumento nos níveis dos linfócitos Ta, está associada com a resposta inflamatória sistêmica descrita na mulher com SPE. O desequilíbrio no perfil de citocinas totais do tipo 1 e do tipo 2 na SPE não foi evidenciado nas células com imunofenótipo CD3<sup>+</sup>, e pode estar presente em outros subtipos celulares específicos como nos linfócitos CD4<sup>+</sup> ou CD3<sup>-</sup>.

## ABSTRACT

Pre-eclampsia syndrome (PES) is a hypertensive disorder of the second half of pregnancy. The clinical signs are part of a severe systemic inflammatory response that includes leukocyte activation. Th1/Th2 cytokine imbalance towards a dominant Th1 profile has been described as a marker of the systemic inflammatory response in PES. The present study evaluated the changes of total Th1/Th2 cytokines in CD3<sup>+</sup> cells and the peripheral blood lymphocytes distribution in women with pre-eclampsia comparing to normotensive pregnant women. Fifty-one pregnant women were included (PES=26, Controls=25). Total leukocytes and lymphocytes counts, percentages of CD3<sup>+</sup> cells (immunocompetent T-lymphocytes), INF- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> cells (T lymphocytes with type 1 cytokine profile), IL-4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> and IL-10<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> cells (T lymphocytes with type 2 cytokine profile), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells (T helper/T cytotoxic lymphocytes) and CD26<sup>+</sup> (dipeptidil-peptidase IV activity) cells were determined in blood samples by 2 color flow cytometric analysis. A higher CD4<sup>+</sup> lymphocyte subset levels in SPE comparing to normal pregnancy group (43.6 $\pm$ 5.8 vs 37.8 $\pm$ 5.7%; P<0.001) was detected. All the others immunological parameters were not significantly different between groups (P>0.05). Activated immune status due higher Th cells levels is associated with systemic inflammatory response described in PES women. Type 1/Type-2 shift in PES was not detected in CD3<sup>+</sup> cells, and may be present in other specific cell types such as in CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup> lymphocytes.

# INTRODUÇÃO

## 1. PRÉ-ECLÂMPسيا

### 1.1 Apresentação clínica

A pré-eclâmpسيا é a denominação à doença gestacional multisistêmica caracterizada pelos sinais clínicos de hipertensão e proteinúria que aparecem após a vigésima semana de gestação. Esta síndrome representa a principal causa de morbi-mortalidade para a mãe e o feto. Nos Estados Unidos, 15 a 20% das causas de morte materna são atribuídas à hipertensão durante a gestação (Sibai et al, 2005; Gifford et al, 2000). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a Doença Hipertensiva da Gestação é responsável por 28% das causas de morte materna na América Latina (Khan et al, 2006). De acordo com os dados oficiais do Ministério da Saúde, no ano de 2001, a razão de mortalidade materna nas capitais brasileiras foi de 74,5 óbitos maternos por 100 mil nascidos vivos sendo que as principais causas são a hipertensão arterial, hemorragias, infecções pós-parto e aborto. Em países desenvolvidos, esta razão oscila de seis a 20 óbitos por 100 mil nascidos vivos (Ministério da Saude, 2008). No Hospital São Lucas da PUCRS, no ano de 2000, foi verificado que a ocorrência de pré-eclâmpسيا foi de 4,6% nas gestantes de baixo risco (Galão et al, 2001). Em recente estudo realizado no estado do Paraná, a ocorrência de pré-eclâmpسيا foi de 6,9% entre os partos ocorridos no período de maio de 2005 à abril 2006 (Peres et al, 2007).

A definição de hipertensão desta doença gravídica é dada pelos valores de Pressão Arterial Sistólica (PAS) e/ou Diastólica (PAD) iguais ou maiores que 140 mmHg e 90 mmHg, respectivamente. A excreção de proteínas em urina de 24 horas maior que 0,3 g define a proteinúria da pré-eclâmpسيا. A pré-eclâmpسيا será considerada severa se houverem aumentos sustentados de PAS igual ou superior a 160 mmHg ou de 110 mmHg para a PAD ou se a

excreção urinária de proteínas for maior ou igual a 5g/24h (Gifford et al, 2000; Sibai et al, 2005).

Considerando-se a incerteza do diagnóstico de hipertensão anterior à gestação, o emprego da terminologia “Síndrome de Pré-Eclâmpsia” (SPE) é uma alternativa, porque, nesta classificação, estão incluídas tanto mulheres que desenvolvem hipertensão e proteinúria exclusivamente na gestação (Pré-eclâmpsia Pura - PEP), quanto às mulheres hipertensas crônicas que, durante o período gestacional, apresentam o agravamento dos níveis pressóricos e o aparecimento ou elevação súbita da proteinúria (Pré-Eclâmpsia Sobreposta à Hipertensão Crônica - PES). Ao se empregar esta definição, o diagnóstico deve ser realizado em até 12 semanas após o parto. Neste período, a pressão arterial e a proteinúria podem retornar aos níveis normais, definindo o diagnóstico de PEP, ou a pressão arterial poderá manter-se elevada, o que caracteriza a hipertensão prévia o que caracteriza o diagnóstico de PES (Odegard et al, 2000). Outro expediente de diferenciação é o exame de fundo de olho, cujo resultado pode revelar a presença de lesão vascular preexistente na paciente hipertensa crônica que já apresenta lesão neste órgão-alvo. A suspeita diagnóstica também existe em gestantes hipertensas com os sintomas de cefaléia, borramento visual, dor no epigástrio e hipocôndrio direito e edema (Gifford et al, 2000).

O início da doença tem relevância para o prognóstico da mesma. Se as manifestações ocorrem antes da 33ª semana de gestação, a morbidade e mortalidade materna e perinatal aumentam quando comparado com o desenvolvimento da doença após a 36ª semana de gestação ou após o parto (Poli de Figueiredo et al, 2007; Sibai et al, 2005).

A pré-eclâmpsia pode evoluir à eclâmpsia quando convulsões, inexplicáveis por outras causas, manifestam-se, ou quando há o desenvolvimento de uma síndrome caracterizada por hemólise, elevação de enzimas hepáticas, contagem baixa de plaquetas (Síndrome *HELLP* –

sigla em inglês que significa *Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet Count*) (Gifford et al, 2000).

A etiologia da pré-eclâmpsia é desconhecida. Muitas hipóteses tentam explicá-la tornando-a conhecida como a patologia das teorias. A disfunção endotelial, herança genética, isquemia placentária e a má-adaptação imune, foco deste trabalho, são as teorias atualmente aceitas (Dekker & Sibai, 1998; Granger et al, 2001).

## 2. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA GESTAÇÃO NORMAL E COM A SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPSIA

Em 1953, Sir Peter Medawar reconheceu a natureza paradoxal da relação imunológica que se estabelece entre a mãe e o feto semi-alogênico. No contexto da biologia dos transplantes, apresentou que o problema imunológico da gravidez poderia ser formulado da seguinte maneira: "Como a mãe permite que o feto, sendo um corpo antígenicamente distinto, pode desenvolver-se durante muitas semanas e meses?" (Medawar, 1953).

Peter Medawar suscitou e estimulou as teorias centrais nesta área; após 50 anos desta publicação, muitas perguntas ainda não foram respondidas. A extensão pelas quais outros fatores podem ser significantes, em particular àqueles relacionados à resposta imunológica materna inata e adaptativa na unidade feto-placentária, além do próprio tecido placentário, ainda não está completamente esclarecida.

### 2.1 Inflamação e Gestação Normal

No processo inflamatório, o sistema imunológico inato reage rapidamente aos estímulos de maneira não específica, enquanto que as reações mediadas pelos componentes do sistema imune adaptativo se desenvolvem lentamente, porém de uma forma precisa e com memória imunológica. A interação entre estes dois sistemas ocorre durante a inflamação, sendo que a ativação do sistema adaptativo necessita dos sinais provenientes do sistema

imune inato. Desta forma, a resposta inflamatória não é necessariamente gerada por estimulação antigênica restrita. (Borzychowski et al, 2006).

Os sinais necessários para ativação dos leucócitos inflamatórios circulantes do sistema imune inato - como as células matadoras naturais (*NK cells*), os monócitos, os macrófagos e os granulócitos - podem ser externos, provenientes de patógenos, ou internos, como os produtos de isquemia e de necrose tecidual (Borzychowski et al, 2006). Quando estas células inflamatórias tornam-se ativadas, são capazes de liberar proteínas que mediam a inflamação e as reações imunes, conhecidas como citocinas e as quimiocinas - (Abbas & Lichtman, 2003). Estas, por sua vez, instruem as células do sistema imune adaptativo, os linfócitos T e B, a formarem respostas antígeno-específica na forma de células citotóxicas ou de anticorpos, além de também secretarem citocinas (Borzychowski et al, 2006).

O fato de que a inflamação não necessita exclusivamente reconhecimento antigênico específico e, portanto, do envolvimento do sistema imune adaptativo para o seu início, torna-se particularmente importante para a compreensão do processo de interação imunológica entre a mãe e o feto.

Diferentemente do transplante de órgãos, o feto escapa da rejeição do sistema imune materno porque o trofoblasto não expressa os antígenos clássicos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) de classe I e de classe II, capazes de induzir à estimulação antigênica nos linfócitos T. A expressão das moléculas não clássicas CPH-G pelo citotrofoblasto parece, por outro lado, não estimular a atividade dos linfócitos T citotóxicos CD8+ e dos linfócitos T auxiliares CD4+, assim como também inibem as células NK (Wilczynski, 2006). Estas últimas, por sua vez, representam o tipo celular predominante no ambiente decidual e apresentam como atividade principal, neste meio, a secreção de citocinas inflamatórias como o interferon gama (IFN $\gamma$ ), e as interleucinas (IL) IL-12, IL-15 e IL-18 (Sacks & Redman, 1999; Sargent et al, 2006), além dos fatores angiogênicos favoráveis à

invasão e implantação do trofoblasto na parede uterina (Lidstrom et al, 2003). Adicionalmente, a expressão de outro determinante imunogenético pelas células trofoblásticas, o CPH-C, também auxilia na prevenção das possíveis reações maternas antifetais. A combinação entre os haplótipos do CPH-C, expresso pelas células trofoblásticas, com os respectivos haplótipos inibitórios no receptor da célula NK uterina (*KIRs, killer cell immunoglobulin-like receptor*) auxilia no controle do repertório das citocinas secretadas por esta célula (Hiby et al, 2004).

Alterações importantes, em termos da composição das células imunes em comparação ao sangue periférico, ocorrem no útero durante a gravidez, contribuindo adicionalmente para o ajuste imunológico materno ao tecido fetal. Os linfócitos T CD3+ e os subtipos CD4+ e CD8+ compreendem, respectivamente, 10%, 6% e 4% da população linfocitária presente na decidua. Cerca de 80% dos leucócitos uterinos presentes são os linfócitos granulares endometriais CD3- semelhante às células NK sanguíneas, porém com o imunofenótipo um pouco diferenciado (CD3-/CD56+<sup>bright</sup>), o que identifica que esta célula apresenta menor atividade citolítica, mas alta capacidade de secreção de citocinas em especial o INF- $\gamma$  (Saito, 2000).

Em função dos tipos celulares imunes que predominam no ambiente uterino e as citocinas secretadas, a implantação do trofoblasto é considerada uma condição pró-inflamatória, porém, sob o controle dos mecanismos citados. Embora algumas das reações inflamatórias neste contexto sejam conhecidas, o estímulo inflamatório local e sistêmico comum a todas as gestações e que se mantém mesmo após a implantação do trofoblasto, ainda não está completamente elucidado. Alguns autores propõem que os produtos particulados chamados de micropartículas produzidos localmente em função da apoptose celular necessária à renovação da superfície placentária, quando em contato com a corrente circulatória materna, podem representar o estímulo inflamatório da gestação (Borzychowski et al, 2006 ; Cockell et

al, 1997; Redman & Sargent, 2007). Germain e colaboradores observaram que os monócitos sanguíneos são capazes de fagocitar micropartículas do sinciciotrofoblasto "in vitro", e, assim, produzir citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-12 (Germain et al, 2002). Dessa forma, mediante o contato com as micropartículas de origem placentária, as células maternas do sistema imunológico inato tornam-se ativadas, tanto localmente quanto sistemicamente. Como apenas durante a gestação estes produtos particulados estão presentes o fenótipo inflamatório atribuído a esta condição pode estar estritamente relacionado à placenta.

Na gestação normal estas interações se expandem com o crescimento da placenta, e atingem a rede inflamatória sistêmica. Alguns marcadores de fase aguda sugerem a presença da resposta inflamatória na mãe que não significa necessariamente doença materna em atividade. Algumas das alterações observadas são: o aumento de fatores pró-coagulantes e redução dos anticoagulantes (Cerneca et al, 1997), leucocitose e ativação de leucócitos (Sacks et al, 1998), ativação do sistema do complemento (Sharmonki et al., 2007) e aumento nos níveis da proteína C reativa (Germain et al, 2002b; Sacks et al, 2004).

Parte da modulação da resposta inflamatória na gestação é atribuída à atividade efetora dos linfócitos T auxiliares. Os linfócitos Ta-CD4+ podem ser classificados em subgrupos, de acordo com as citocinas que secretam e as respostas que as mesmas produzem, em linfócitos dos tipos Ta0, Ta1 ou Ta2. Durante o seu processo de diferenciação, os linfócitos CD4+ com fenótipo Ta0, isto é, células com atividade efetora ainda não discriminada, podem se diferenciar nas células Ta1, que sintetizam IL-2, INF- $\gamma$  e TNF- $\beta$  e participam do processo inflamatório por ativar a imunidade celular, ou nas células Ta2 que sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e estimulam a produção de anticorpos. Este padrão polarizado de secreção de citocinas é caracterizado por ser mutuamente inibitório para a respectiva diferenciação celular



Ta1 e Ta2. Ou seja, o IFN $\gamma$  seletivamente inibe a proliferação das células Ta2, ao passo que a IL-10 inibe a síntese das células Ta1 (Mosmann & Sad, 1996).

Por observar que as células presentes na unidade fetoplacentária de cobaias espontaneamente secretam as citocinas Ta2 (IL-4, IL-5 e IL-10), enquanto que os linfócitos presentes no baço e linfonodos maternos não secretam as mesmas citocinas, Wegmann e colaboradores propuseram que a sobrevivência do enxerto fetal estaria relacionada ao predomínio das citocinas Ta2. A este processo de adaptação imune induzido pela gestação, chamou de “hipótese imunotrófica” (Wegmann et al, 1993). O desvio da resposta imunológica materna a favor da condição antiinflamatória é inferido através do decréscimo na razão celular Ta1/Ta2, descrito tanto na placenta (Saito, 2000) quanto no sangue periférico (Holmes et al, 2003). Clinicamente, a importância do padrão dominante de citocinas Ta2 é corroborada pela observação de que gestantes com artrite reumatóide - doença auto-imune associada à expansão das células CD4+ e ao aumento do IFN $\gamma$  - apresentam remissão dos sintomas, ao passo que gestantes com lúpus eritematoso - doença auto-imune associada à produção de imuno-complexos - mostram sinais de exarcebação da doença (Del Prete et al, 1994; Al-Shammri et al, 2004; Tchórzewski et al, 2000).

Recentemente observou-se que outras células imunológicas, além dos linfócitos CD4+, também apresentam a mesma polaridade funcional, como os linfócitos T-CD8+ (Cerwenka et al, 1998) e as células NK (Borzychowski et al, 2005). Esta última, ainda, pode influenciar no desvio funcional dos linfócitos Ta através da produção das citocinas regulatórias como a IL-12 e o IFN $\gamma$ , beneficiando o fenótipo Ta1 ou a produção de IL-4, favorecendo o fenótipo Ta2. De acordo com o tipo de marcador selecionado para o estudo das citocinas linfocitárias, a terminologia empregada sofre modificações. Por considerar que os linfócitos CD8+ secretam as citocinas Ta1 e Ta2 típicas dos linfócitos CD4+, a avaliação também pode ser feita na população linfocitária total CD3+. Nessa situação, a terminologia recentemente empregada

classifica as citocinas inflamatórias e antiinflamatórias produzidas pelos linfócitos totais T1 e T2, em citocinas do tipo 1 e do tipo 2 (Shi et al, 2007; Carter & Swain, 1997) respectivamente. Já o mesmo padrão de citocinas nas células NK é referido como NK1 e NK2 (Shi et al, 2007).

Embora a hipótese imunotrófica indique que as modificações no padrão de citocinas durante a gestação ocorram nas células do sistema imune adaptativo, evidências recentes apontam para o envolvimento preferencial das células do sistema imune inato. Shi e colaboradores observaram que a produção de IFN $\gamma$  pelas células NK foi menor nas células mononucleares de gestantes em comparação às não-grávidas. Os autores não observaram alterações significativas na expressão das citocinas do tipo 1 e do tipo 2 nos linfócitos T-CD3+ entre os grupos de comparação, atribuindo, dessa forma, o papel modulador às células do sistema imune inato durante a gestação (Shi et al, 2007).

## **2.2 Inflamação e Pré-Eclâmpsia**

A doença hipertensiva da gestação ainda não tem a(s) sua(s) causa(s) completamente conhecida(s). A síndrome de pré-eclâmpsia descreve a condição representada por um conjunto de manifestações clínicas em variados graus, o que sugere a improbabilidade de que apenas um fator a explique.

A presença do sistema imune materno alterado na fisiopatologia da pré-eclâmpsia é inferida por algumas evidências epidemiológicas. Nesse sentido, a primigestação e a primipartenidade, o curto período de exposição ao mesmo sêmen, gestação múltipla, a presença de anticorpos anti-fosfolípídeos e as condições inflamatórias crônicas (obesidade, a hipertensão preexistente ou diabetes) estão positivamente associadas ao desenvolvimento da doença (Duckitt et al, 2005). Em contrapartida, as múltiparas e mesmo as nulíparas que sofreram aborto espontâneo ou induzido, preferencialmente com o mesmo parceiro, apresentam efeito protetor. Essas observações sugerem que mecanismos de reconhecimento e

de indução de tolerância aos antígenos paternos são formados na primeira gestação. Nas gestações subseqüentes, esta resposta tolerante deve aprimorar-se e expandir-se rapidamente, reduzindo o risco de má-adaptação imune e possível rejeição ao feto (Saito et al, 2007).

Diante das teorias existentes que tentam explicar a doença, é comumente aceito a importância da placenta na pré-eclâmpsia, em especial das células trofoblásticas presentes neste tecido, uma vez que a sua remoção representa a cura. A placentação inadequada, descrita como a restrita invasão das células trofoblásticas e o conseqüente remodelamento defeituoso das arteríolas espiraladas uterinas resultando na formação de canais vasculares com baixa resistência ao estímulo vasodilador, está associada à doença. A placenta que assim se desenvolve em ambiente isquêmico poderá ocasionar, em um estágio mais avançado da gestação, os sinais clínicos maternos de hipertensão e proteinúria bem como as alterações no sistema de coagulação e a disfunção hepática. Nos casos em que os sinais clínicos se manifestam precocemente, isto é, antes da 33ª semana gestacional, o feto pode sofrer carência nutricional, insuficiência respiratória, asfixia e até a morte. De acordo com Ness e Roberts e, posteriormente apoiado por Redman e Sargent, esta descrição simplificada refere-se à chamada “pré-eclâmpsia placentária”, ou seja, uma categoria da doença cujo problema origina-se na placenta que se desenvolve em ambiente com pouca perfusão sanguínea e com sinais de estresse oxidativo (Ness & Roberts, 1996; Redman & Sargent, 2005).

Já a “pré-eclâmpsia materna” se refere à outra categoria da doença, que segundo a interpretação dos mesmos autores, resulta da interação entre a placenta normal com os fatores constitucionais da mãe relacionados às condições crônicas preexistentes - hipertensão, diabetes, obesidade e auto-imunidade – ou a outros fatores predisponentes à doença cardiovascular que podem não estar clinicamente evidentes e que podem favorecer a resposta imunológica materna exagerada durante a gestação; dessa forma, a doença não estaria necessariamente associada à presença da placenta anormal (Ness & Roberts, 1996; Redman &

Sargent, 2005). No entanto, as categorias apresentadas são de difícil distinção clínica e laboratorial, já que não existe um marcador diferencial para tanto. As formas de apresentação mista da doença, isto é, a combinação entre fatores maternos e placentários, são, provavelmente, as mais comuns.

Independente das categorias propostas, a resposta inflamatória sistêmica mais intensa do que na gestação normal, expressa através da excessiva ativação de neutrófilos e monócitos (Sacks et al, 1998; Redman & Sargent, 2004; Redman et al, 1999), das células NK, dos linfócitos CD4+ e CD8+ (Saito et al, 1999a) e do aumento das citocinas inflamatórias (Saito et al, 1999; Rein et al, 2002; Raghupathy, 1997; Sakai et al, 2004; Darmochwal-Kolaraz et al, 1999; Henessy et al, 1999) está descrita na pré-eclâmpsia. Como a inflamação também ocorre na gestação normal (Naccasha et al, 2001), a síndrome pode ser considerada como um extremo da resposta inflamatória adaptativa gerada normalmente pela própria gestação (Redman & Sargent, 2004, Redman et al, 1999).

No que diz respeito ao envolvimento das células imunes, especula-se que a maior concentração de micropartículas de origem endotelial e de células trofoblásticas observada no plasma de mulheres pré-eclâmplicas possa ser um dos fatores responsável pela inflamação exacerbada (González-Quintero et al, 1999; Knight et al, 1998; Ishiara et al, 2002; Redman, 2000), uma vez que estes debris celulares interagem com as células inflamatórias na circulação resultando na secreção de citocinas Ta1 (Germain et al, 2002). Na pré-eclâmpsia, a excessiva carga de micropartículas e também as modificações estruturais nas mesmas – como a maior expressão de adesinas endoteliais e da molécula de adesão intercelular (VanWijik et al; 2002), por exemplo - podem estimular ainda mais a secreção das citocinas inflamatórias pelas células do sistema inato (IL-12, IL-18 e IFN $\gamma$ ) e, por conseqüência, ativação dos linfócitos Ta1 (Borzychowski et al, 2006). Além disso, a imunidade Ta1 parece estar presente

nos linfócitos decíduais das pacientes com pré-eclâmpsia (Wilczynski et al., 2002), o que pode contribuir para a maior resposta inflamatória local.

Durante muito tempo a hipótese imunotrófica tornou-se uma ferramenta laboratorial bastante utilizada para os estudos da imunobiologia da gestação e da pré-eclâmpsia. Entretanto, recentes evidências questionam o paradigma quanto à necessidade do padrão de citocinas  $Ta2$  para o sucesso da gravidez, uma vez que doenças sistêmicas originadas das respostas  $Ta2$  dominantes a alo- ou auto-antígenos resultando na formação de imunocomplexos, como o lúpus eritematoso, podem causar complicações maternas e/ou fetais como abortamento recorrente ou pré-eclâmpsia sobreposta (Chamley, 2002). Além disso, no modelo animal, a excessiva ativação da resposta  $Ta2$  também contribui para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia (Hayakawa et al, 2000). O questionamento também se faz pertinente quanto ao efeito deletério das reações mediadas pelas citocinas  $Ta1$  na gestação, já que alguns estudos mostram que os níveis séricos das citocinas  $Ta1$  estão elevados e não diminuídos na gestação normal (Matthiesen et al, 1998), ou que o padrão de expressão de citocinas  $Ta1/Ta2$  não é diferente na pré-eclâmpsia em comparação à gestação normal (Jonsson et al, 2004; Borzychowski et al, 2005).

Desta maneira, a teoria imunotrófica, atualmente, é motivo de debate. A extensão pela qual as respostas mediadas pelas células T tornam-se ativadas na gestação, e se isto é diferente na pré-eclâmpsia, não é consensual. Além disso, o conhecimento de que a maior fração das células imunes na decídua são as células do sistema imune inato ao invés do adaptativo, e que essas interagem com o tecido fetal e provavelmente com o sangue periférico materno, sugerem a necessidade de esclarecimentos quanto à identificação dos tipos celulares que contribuem para o estado inflamatório durante a gestação.

### 3. QUANTIFICAÇÃO DAS CELULAS PRODUTORAS DAS CITOCINAS DO TIPO 1 E DO TIPO 2 POR CITOMETRIA DE FLUXO

O estudo do comportamento das células que apresentam a polarização da resposta efetora através da secreção de citocinas tornou-se importante para o entendimento da resposta imunológica em várias doenças. Em função disto, os métodos para a sua quantificação são extensivamente estudados e aprimorados.

No contexto da pré-eclâmpsia, os estudos que avaliam a dicotomia de citocinas Ta1/Ta2 através da quantificação sérica, plasmática ou no sobrenadante de cultura celular e que empregam, para tanto, os métodos imunoenzimáticos, mostram resultados discrepantes quanto à detecção do aumento da razão de citocinas Ta1/Ta2, e, também, resultados de difícil comparação (Arriaga-Pizzano et al, 2005; Madazli et al, 2003; Dong e Wang, 2005). Tais discrepâncias podem estar relacionadas ao fato de que as citocinas agem de maneira parácrina e rapidamente ligam-se aos seus receptores nas células vizinhas, o que torna sua detecção nos fluidos corporais ou no sobredanante de cultura celular menos representativo da sua secreção. Outra limitação importante diz respeito à incapacidade de se estudar a contribuição celular individual para a secreção das citocinas em uma população heterogênea, já que outras fontes que não apresentam a polarização Ta1 e Ta2 também devem ser consideradas nestes resultados (Carter & Swain, 1997).

O método para avaliar a produção das citocinas através da sua coloração intracelular e subsequente análise em tipos celulares selecionados pela marcação fluorescente (*FACS analysis- Fluorescence Activated Cell Sorter*) já foi desenvolvido. Brevemente, esta técnica envolve a estimulação “in vitro” das células de interesse na presença de substâncias ativadoras da expressão de citocinas e também a sua exposição na presença de substâncias que bloqueiam a secreção das proteínas produzidas permitindo a sua marcação intracelular. Este método apresenta algumas vantagens para o estudo das citocinas, a saber: (1) permite a rápida

aquisição e análise de um grande número de células em suspensão individualmente (*single cell analysis*). Este fato é particularmente importante, pois mesmo após a estimulação “*in vitro*” a frequência das células produtoras de citocinas, em especial às Ta2, é muito baixa; (2) além da determinação do percentual de células positivas para a citocina em análise, também é possível identificar a sub-população responsável pela sua produção através da imunofenotipagem simultânea de superfície; (3) possibilidade de se quantificar o conteúdo protéico intracelular, uma vez que se comparando com a medida do conteúdo do mRNA e dos níveis de citocinas em sobrenadante de cultura celular - determinado por PCR e ensaios imunoenzimáticos, respectivamente - existe discrepância nas informações (Santiago et al, 2000; Carter & Swain, 1997).

Considerando-se que um dos achados imunológicos mais característicos na pré-eclâmpsia é a ativação do sistema imune inato e adaptativo e a sugestão de que a doença altera o padrão de citocinas Ta1/Ta2 linfocitária, bem como a disponibilidade da automação em citometria de fluxo em nosso meio, a intenção do presente trabalho foi de comparar parâmetros imunológicos e hematológicos que possam distinguir a resposta inflamatória sistêmica descrita na pré-eclâmpsia em comparação à gestação normal.

## HIPÓTESE

A resposta inflamatória sistêmica presente na síndrome de pré-eclâmpsia é caracterizada pela expressão aumentada de citocinas do tipo 1 nos leucócitos circulantes em comparação à gestação normal.



# OBJETIVOS

## 1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar o perfil imunológico T1/T2 e a distribuição de subtipos linfocitários em gestantes no terceiro trimestre de gestação com e sem pré-eclâmpsia assistidas no Hospital São Lucas da PUCRS.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em mulheres no terceiro trimestre de gestação com e sem síndrome de pré-eclâmpsia:

- determinar e comparar o perfil linfocitário de citocinas T1/T2;
- determinar e comparar a distribuição dos subtipos linfocitários CD3+, CD4+, CD8+ e CD26+;

# PACIENTES E MÉTODOS

## 1. DEFINIÇÕES PARA O TRABALHO

As definições utilizadas neste trabalho foram:

Idade Gestacional considerada: corresponde ao número de semanas contadas a partir do primeiro dia da última menstruação (DUM) confiável e/ou ultra-sonografia precoce até a data da coleta do sangue para o estudo.

Hipertensão: pressão arterial sistólica igual ou maior a 140 mmHg e pressão arterial diastólica maior ou igual a 90mmHg, consideradas as fases I e V dos sons de Korotkoff, respectivamente.

Proteinúria patológica: excreção urinária de proteínas acima de 300 mg em 24 horas. A proteinúria patológica também pode ser estimada a partir da relação proteína/creatinina em amostra aleatória de urina quando  $> 0,3$

Gestação normotensa (GN): mulheres com 20 semanas ou mais de gestação, sem histórico e/ou tratamento prévio para hipertensão arterial, endocrinopatias, nefropatias, hepatopatias ou doenças auto-imunes e ausência de processo infeccioso inflamatório agudo.

Síndrome de Pré-Eclâmpsia (SPE): atribuição diagnóstica para pacientes com PES ou PEP. Naquelas pacientes avaliadas em consulta ao Ambulatório de Hipertensão 90 dias após o parto, este diagnóstico é substituído pelo de PEP ou PES.

Pré-eclâmpsia Pura (PEP): síndrome específica da gestação caracterizada por hipertensão e proteinúria patológica após a 20ª semana gestacional em mulheres previamente normotensas. A proteinúria e a hipertensão devem retornar ao normal em até 12 semanas após o parto.

Pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica (PES): desenvolvimento de pré-eclâmpsia em paciente com hipertensão crônica.

Células T1: Linfócitos de sangue periférico que apresentam marcação de superfície anti-CD3+ e também as marcações intracitoplasmáticas antiinterleucinas do tipo 1, IFN $\gamma$ + ou IL-2+.

Células T2: Linfócitos de sangue periférico que apresentam marcação de superfície anti-CD3+ e também as marcações intracitoplasmáticas antiinterleucinas do tipo 2, IL-4+ ou IL-10+.

Razão T1/T2: Divisão do percentual das células T1 e T2. As seguintes combinações de interleucinas T1 e T2 foram utilizadas neste estudo para a composição da razão T1/T2: IFN $\gamma$ /IL-4, IFN $\gamma$ /IL-10, IL-2/IL-4 e IL-2/IL-10.

## 2. DELINEAMENTO

Estudo transversal, observacional, prospectivo e controlado.

## 3. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Ambulatório de Nefrologia, Ambulatório de Obstetrícia, Centro Obstétrico, Unidade de Gestantes de Alto Risco do Serviço de Obstetrícia e Laboratórios de Nefrologia e Biologia Celular e Doenças Respiratórias do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB)/PUCRS.

## 4. PACIENTES

As amostras foram provenientes de gestantes que receberam assistência no Hospital São Lucas da PUCRS. O critério de amostragem utilizado para a seleção das pacientes foi o de

conveniência conforme os níveis pressóricos e os critérios laboratoriais e clínicos compatíveis com o propósito do estudo. Desta forma, as pacientes foram classificadas como pertencentes ao grupo SPE (Síndrome de Pré-Eclâmpsia) em acompanhamento no Centro Obstétrico ou pertencentes ao grupo GN (gestantes normais) assistidas no Centro Obstétrico ou do Ambulatório de Obstetrícia. Estas foram escolhidas por semelhança de tipo racial, idade e trimestre gestacional.

#### **4.1. Critérios de inclusão**

Gestante normal ou com síndrome da pré-eclâmpsia com 20 ou mais semanas de gestação, datada por última menstruação (DUM) considerada confiável ou por ultrasonografia e atendidas no Ambulatório de Obstetrícia e/ou Centro Obstétrico do HSL da PUCRS e na Unidade de Gestantes de Alto Risco do Serviço de Obstetrícia. Todas as pacientes conheciam a presente linha de pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

#### **4.2. Critérios de exclusão**

Foram excluídas do estudo as mulheres que pediram sua exclusão, mulheres com gestação múltipla, aquelas que, uma vez classificadas como gestante normal, apresentaram uma ou mais cruzes de proteína no exame qualitativo de urina (EQU) – sinal de proteinúria incipiente; com histórico de doenças auto-imunes e mulheres cuja gestação vigente apresentasse alguma outra(s) complicação (ões) além de SPE como síndrome antifosfolípideo e crescimento intra-uterino restrito. Foram excluídas também mulheres com história prévia de diabetes, hepatopatia, tireoideopatia e nefropatia relatadas pela paciente e pela conferência de prontuário médico-hospitalar, bem como as gestantes HIV+ e àquelas que retornaram ao Ambulatório de Nefrologia/Doença Hipertensiva Gestacional para acompanhamento pós-parto com outra patologia diferente de hipertensão.

### **4.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS sob número de protocolo CEP:04/02230 na data 16/06/2005, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) constante do Anexo 1. Posteriormente, procedeu-se a identificação das gestantes a serem incluídas; após a informação sobre a pesquisa, a inclusão de cada paciente se consumou com a assinatura do TCLE. O período de coleta iniciou em setembro de 2006 e terminou em novembro de 2007.

### **4.4. Fatores em estudo**

Nível absoluto dos leucócitos totais de sangue periférico (células/ $\mu$ l), nível percentual de linfócitos, CD3+ e subtipos CD4+ e CD8+, CD26+, CD4+CD26+, CD3+INF $\gamma$ +, CD3+IL-2+, CD3+IL-4+, CD3+IL10+.

### **4.5 Tamanho Amostral**

Para a estimativa do tamanho amostral, considerando-se o percentual de linfócitos Ta1/Ta2, o  $\alpha$  fixado foi de 5% e o poder de 90% ( $\beta=10\%$ ); a magnitude de efeito estimada foi de 1.33, resultando em 15 pacientes por grupo. O cálculo foi realizado utilizando-se o programa PEPI 4.0 e os dados baseados no estudo de Saito e colaboradores (Saito et al, 1999).

## **5. PROCEDIMENTOS TÉCNICO-LABORATORIAIS**

### **5.1. Medida da pressão arterial sistêmica:**

A medida da pressão arterial foi realizada na paciente sentada com as pernas descruzadas após 20 minutos de repouso, e com a certificação de que não havia ocorrido ingestão de bebidas alcoólicas, café, alimentos ou consumo de tabaco 30 minutos antes da realização da medida. Utilizou-se esfigmomanômetro com coluna de mercúrio calibrado e manguito adequado ao diâmetro do braço, medindo-se no braço direito ao nível do coração.

Para as pacientes primeiramente identificadas com hipertensão, o mesmo procedimento foi realizado em um intervalo posterior de 4 horas para a confirmação da hipertensão, sendo este o resultado registrado. (Gifford et al, 2000). Considerou-se para o valor sistólico o registro do primeiro ruído auscultado dos sons de Korotkoff (fase I – quando se inicia a ouvir os sons), e para o valor diastólico o registro ao quinto ruído auscultado dos sons de Korotkoff (fase V – quando cessa a ausculta dos sons).

## **5.2. Protocolo de Inclusão no estudo**

Após o consentimento para participação no estudo, foi preenchido um protocolo de inclusão (Anexo 2) padronizado para os estudos da Doença Hipertensiva Gestacional do Laboratório de Nefrologia, que consta de dados de anamnese, exames físico e complementar das pacientes, bem como os dados do parto e do recém-nascido.

Além das dosagens laboratoriais, foram obtidos dados demográficos da paciente e do parto além da história médica pregressa materna e familiar: idade materna (anos), raça (branca, negra, outras), histórico de abortamento (sim, não), causa do abortamento (espontâneo, provocado), histórico de hipertensão em gestação anterior (sim e não), histórico de hipertensão familiar e grau de parentesco, infecção urinária de repetição (infância, idade adulta), idade gestacional obstétrica (semanas), peso da placenta (g) e do recém-nascido (g) com os índices Apgar nos primeiro e quinto minutos após o nascimento (0 a 10) e sexo do recém-nascido (masculino e feminino). Os recém-nascidos foram classificados quanto ao seu crescimento intra-uterino em: adequado para a idade gestacional (AIG), pequeno para a idade gestacional (PIG) ou grande para a idade gestacional (GIG), segundo a classificação de peso e idade gestacional dos recém-nascidos do Centro Médico da Universidade do Colorado (Ballard et al, 1991).

### 5.3. Obtenção das amostras de sangue periférico

Após a devida abordagem das pacientes, procedeu-se à punção asséptica (álcool 70°) de sangue venoso periférico utilizando-se seringas de 10 ml (BD Plastipak) e agulhas de calibre 25X8mm (BD Pharmingen). O sangue foi transferido para tubos contendo K<sub>3</sub>-EDTA (Sistema Vacuette, BD Pharmingen). Este procedimento foi realizado pela equipe de enfermagem assistente no leito da paciente, mediante seu consentimento, ou nas consultas rotineiras no Ambulatório de Obstetrícia. Todas as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Nefrologia-Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS e mantidas à temperatura ambiente até o processamento para as análises por citometria de fluxo.

### 5.4. Análises laboratoriais

Outros exames laboratoriais das pacientes que constam no Protocolo de Coleta Padronizado (Anexo 2) foram solicitados pelo Serviço de Obstetrícia mediante o ingresso da paciente no hospital. A determinação dos níveis séricos de creatinina sérica (normal 0,5-1,2 mg/dl) foi realizada pelo método de Jaffé sem desproteinização. O nível sérico de ácido úrico foi determinado por método enzimático-colorimétrico automatizado (normal 2-6,6 mg/dl). A proteinúria foi determinada por método turbidimétrico, com leitura espectrofotométrica. A medida de proteinúria foi determinada em amostra isolada de urina e/ou em urina de 24 horas quando era possível, especialmente nos casos em que a interrupção da gestação não estava prescrita para as pacientes pré-eclâmpticas. A medida da creatinina urinária foi realizada por método automatizado (Mega-Bayer). Para este estudo, além da proteinúria em urina de 24 horas, considerou-se a relação proteinúria/creatininúria de amostra. Valores acima 0,3 foram considerados como patológicos (Zadehmodarres et al, 2006).

A contagem absoluta de leucócitos (normal: 3.600-11.000 céls/ $\mu$ l), de plaquetas (normal: 140.000-360.000/ $\mu$ l), hematócrito (normal: 42  $\pm$  6%) e hemoglobina (normal: 13,6 $\pm$

2 g/dl) (Failace, 2006) foi determinada por contador hematológico Coulter STKS. Todos os exames bioquímicos e hematológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS.

## 6. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo analisa quantitativamente as propriedades químicas e físicas de um subtipo celular pertencente a uma população heterogênea (*single cell analysis*) suspensa em uma corrente de fluxo líquida, através da incidência de um feixe de luz. Gráficos de distribuição de frequências (histogramas) são gerados e correlacionados com parâmetros tais como tamanho, complexidade ou granulosidade celular e também com as características de coloração fluorescente dependendo do marcador empregado (FITC- isotiocinato de fluoresceína ou PE- ficoeritrina, por exemplo) quando excitados pelo feixe luminoso.

Lasers de Argônio emitindo luz a 488 nm são os mais comumente usados nos citômetros de fluxo, uma vez que este comprimento de onda permite a excitação de muitos fluorocromos utilizados. Os fótons de luz dispersos ou emitidos pelas células são separados em comprimentos de onda por uma série de filtros e espelhos, cada qual captado por detectores individuais que geram impulsos elétricos proporcionais à quantidade de luz incidente. O detector *Forward Scatter (FSC)* encontra-se na linha do laser e atrás da zona onde passam as células, e realiza uma estimativa do volume a partir da quantidade de luz dispersa. O detector *Side Scatter (SSC)*, que está perpendicular à direção do laser, fornece uma medida da complexidade das células, ou seja, forma do núcleo ou granulosidade citoplasmática. Já os detectores de fluorescência (FL1, FL2, FL3 ou mais) estão perpendiculares à direção do laser e captam a quantidade de luz emitida pela substância fluorescente ligada à superfície ou internamente à célula quando excitadas pela fonte de luz gerada pelo laser, como demonstra a Figura 1 (adaptada de *Flow Cytometry Laboratory*, 2008). Cada sinal é convertido em um número e acumulado em uma frequência.



Posteriormente tais parâmetros podem ser correlacionados em histogramas de dispersão (*dot plots*) e comparados estatisticamente.

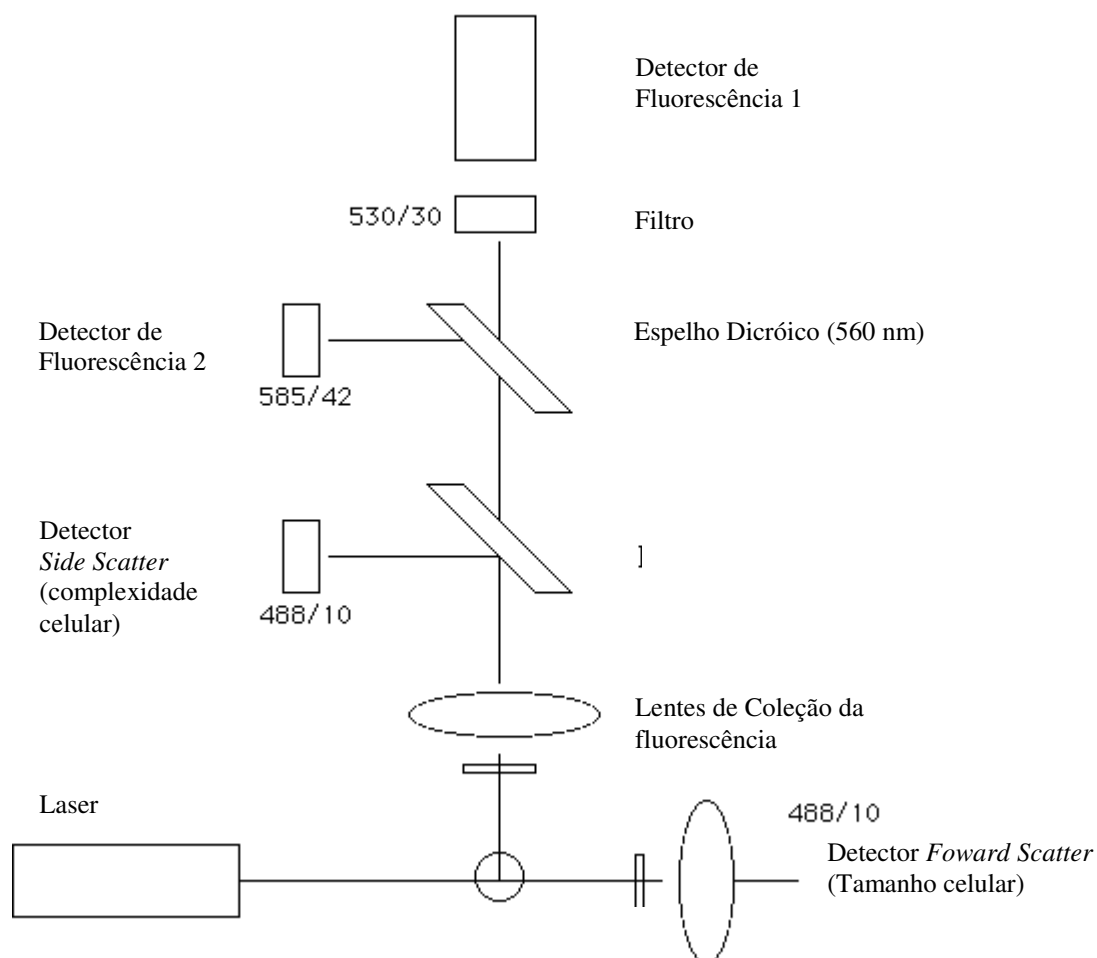


Figura 1. Diagrama dos componentes ópticos do citômetro (adaptado de *Flow Cytometry Laboratory*, 2008).

As amostras deste trabalho foram adquiridas no citômetro de fluxo FACScan Calibur (Becton-Dickinson) usando laser de Argônio (488 nm) no Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. A compensação das fluorescências para a leitura das amostras foi determinada com o auxílio do reagente BD CaliBRITE™ 3 *three-color-kit* (número do catálogo: 340486). A fluorescência detectada pelo detector FL1 (FITC, amarelo-verde) foi coletada a 535 nm, a fluorescência detectada pelo

detector FL2 (PE, vermelho-laranja) foi coletada a 575 nm. Considerando-se o fato de que cada fluorocromo emite luz além do seu comprimento de onda selecionado, passível de sobreposição espectral, a compensação das fluorescências também foi ajustada em células positivas marcadas para cada fluorocromo utilizado isoladamente. A compensação para as fluorescências PE e FITC utilizadas para as aquisições neste trabalho foram de aproximadamente 15,7% para FITC sobrepondo-se na fluorescência PE, e de 1,3% da fluorescência PE sobrepondo-se a FITC. Já a compensação para os detectores FSC e SSC foi determinada utilizando-se amostras de sangue total lisadas (*FACS Lysing Solution*, BD Pharmingen™, número do catálogo: 349200), bem como células linfomononucleares (LFMN) separadas por gradiente de centrifugação. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software para citometria WinMdi versão 2.8.

### **6.1. Marcação intracitoplasmática de citocinas I L-2, IL-10 e IL-4 em linfócitos CD4+**

A proposta inicial do presente trabalho foi de mensurar os níveis de expressão intracitoplasmáticos das citocinas IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10 e IL-4 em linfócitos que expressam o antígeno de superfície CD4+ (T helper, T ativadores). Para tanto, de acordo com o protocolo estabelecido pelo kit empregado *Cytodetect™ Kit* (IQP Products, número catálogo IQP- 366), primeiramente, os linfócitos foram marcados quanto ao antígeno de superfície CD4+ e, posteriormente, submetidos à cultura celular por um período de 5 horas, em ambiente controlado (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) na presença de substâncias ativadoras da expressão de citocinas intracelulares PMA (forbol -12- miristato -13- acetato) e ionomicina cálcica, além da presença de bloqueadores do complexo de Golgi (monensina) que impede o transporte intracelular de citocinas permitindo seu acúmulo para a detecção.

A partir da população selecionada para análise (Figura 2), os experimentos iniciais revelaram a impossibilidade de distinção entre as populações CD4+ de CD4- (Figura 3) após o período de incubação celular, o que dificultou a análise por citometria de fluxo para a

evidenciação dos subtipos linfocitários testados IL-4+/CD4+, IL-10+/CD4+ e IL-2+/CD4+, conforme ilustram as Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

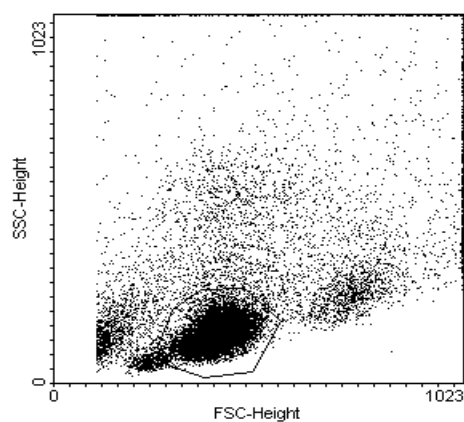


Figura 2. Seleção da população linfocitária de acordo com as características de tamanho e granulosidade após cultura celular.

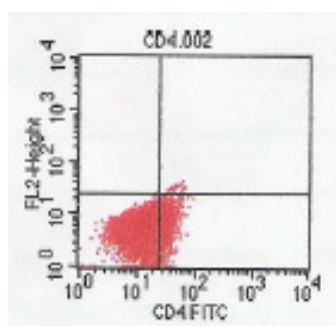


Figura 3. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD4 em linfócitos após a cultura celular.

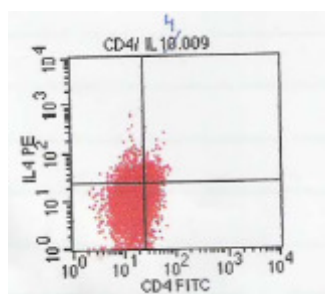


Figura 4. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti IL-4 em linfócitos após a cultura celular.

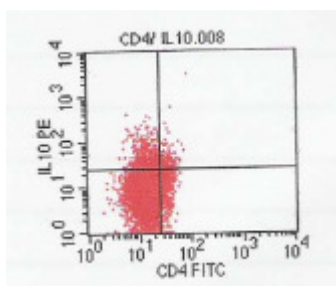


Figura 5. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti-IL-10 em linfócitos após a cultura celular.

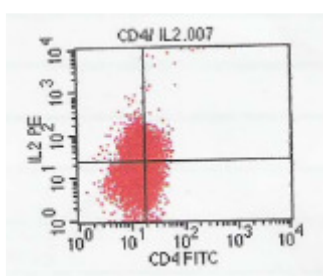


Figura 6. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti-IL-2 em linfócitos após a cultura celular.

Diante de tal dificuldade, a opção pela marcação da molécula de superfície pan-linfocitária CD3<sup>+</sup> foi a alternativa escolhida uma vez que o decréscimo de sua expressão após o período de incubação é o menor quando se compara com os níveis pré-incubação, possibilitando, portanto, a distinção entre as populações CD3<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>. A Figura 7 mostra um *dot plot* representativo de um experimento referente à marcação linfocitária anti-CD3 após cultura celular nas condições empregadas neste trabalho para a expressão das citocinas intracitoplasmáticas.

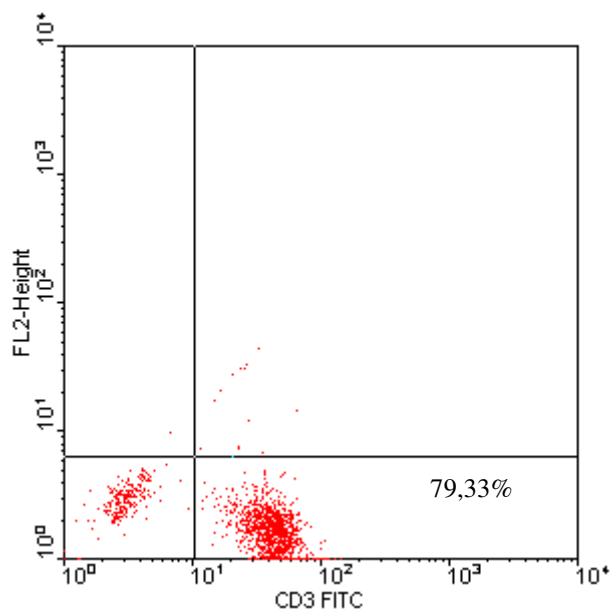


Figura 7. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD3 em linfócitos após a cultura celular.

## 6.2. Marcação intracitoplasmática das citocinas IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-4 em linfócitos CD3+.

Para a determinação dos níveis percentuais de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos CD3+, procedeu-se conforme descrito no kit comercial *Cytodetect<sup>TM</sup> Kit* (IQP Products, número catálogo IQP- 366).

As amostras de sangue anticoaguladas foram diluídas 1:1 em tampão PBS diluído (*Phosphate Buffer Solution*, pH 7,3). A seguir, procedeu-se a separação dos linfomononucleares (LFMN) por gradiente de centrifugação utilizando-se a solução de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich). As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em meio nutritivo RPMI-1640 com vermelho de fenol (LGC Biotecnologia, número do catálogo:BR-30011.05). Uma vez ajustada à concentração celular ( $2 \times 10^6$  céls/ml), alíquotas de 1,0 ml da suspensão de LFMN foram distribuídas em placas testes de 24 caçapas (TPP, número no catálogo: 92024) na presença de 10 $\mu$ l de substâncias ativadoras da expressão intracelular de citocinas - PMA e ionomicina cálcica - e também do bloqueador do transporte intracelular de citocinas - monensina - previamente diluídas em RPMI-1640 (1000x, 50x e 100x,

respectivamente), conforme orientação do fabricante. Nesta condição, as células foram incubadas por 5 horas em ambiente umidificado, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Sanyo CO<sub>2</sub> incubator). A viabilidade celular pré-incubação foi determinada pelo método de exclusão do corante (Azul de Tripán). Mais de 95% das células linfomononucleares apresentaram coloração negativa para os experimentos realizados.

Após o período de incubação, a suspensão celular foi lavada em tampão PBS diluído, centrifugada e o sedimento foi ressuspenso e incubado (10 minutos, temperatura ambiente) com solução fixadora pronta para uso fornecida pelo kit. A seguir, as células LFMN foram lavadas e ressuspenso em 1,0 ml de tampão PBS diluído.

Após a fixação, procedeu-se a incubação com 10µl do marcador de superfície celular anti-CD3-FITC (BD Pharmingen<sup>TM</sup>, número do catálogo: 555332), por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, as células foram permeabilizadas e coradas (10µl, 20 minutos, 4°C) quanto aos marcadores intracitoplasmáticos empregando-se anticorpos monoclonais anti-IFN $\gamma$  PE (IQP Products, número do catálogo: IQP-160R), anti-IL-10 PE (IQP Products, número do catálogo: IQP-165R) e anti-IL-4 PE (IQP Products, número do catálogo: IQP-162R), em tubos 12X75mm de citometria devidamente identificados. Após a marcação intracitoplasmática, as células foram lavadas e ressuspenso em 500µl de tampão PBS diluído. Controle isotópico apropriado para a detecção das fluorescências PE e FITC não-específicas - *Simultest<sup>TM</sup> Control  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2a* (BD-Pharmingen, número do catálogo: 340041) - foi utilizado e processado da mesma forma que as demais marcações.

Vinte mil eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson) e analisados com auxílio do software WinMdi versão 2.8.

As células mononucleares foram analisadas de acordo com suas características de tamanho e granulosidade, conforme a Figura 8. A seguir, de acordo com as Figuras 9,10 e 11,

a correlação entre as fluorescências FITC (CD3) e PE (INF $\gamma$ ,IL-10 e IL4) foi determinada, respectivamente. As Figuras 12 e 13 representam os *dot plots* observados, considerando-se o mesmo tipo de análise, para o controle isotópico empregado e marcação anti-CD3 após cultura celular, respectivamente.

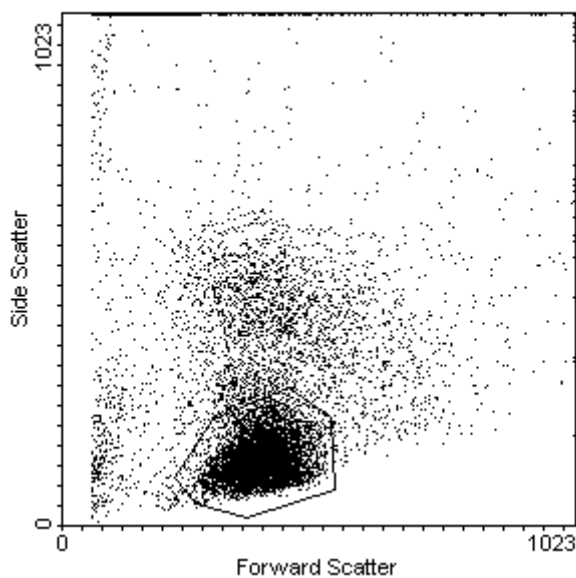


Figura 8 Seleção da população linfocitária de acordo com as características de tamanho e granulosidade após cultura celular.

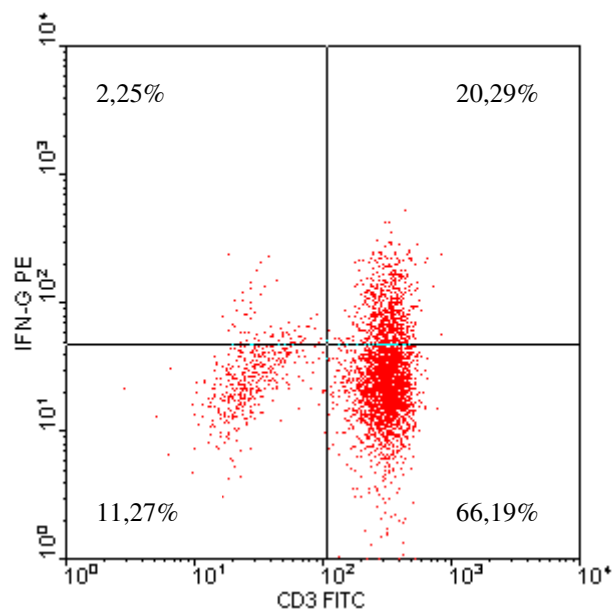


Figura 9. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD3 e anti-IFN $\gamma$  em linfócitos após a cultura celular.

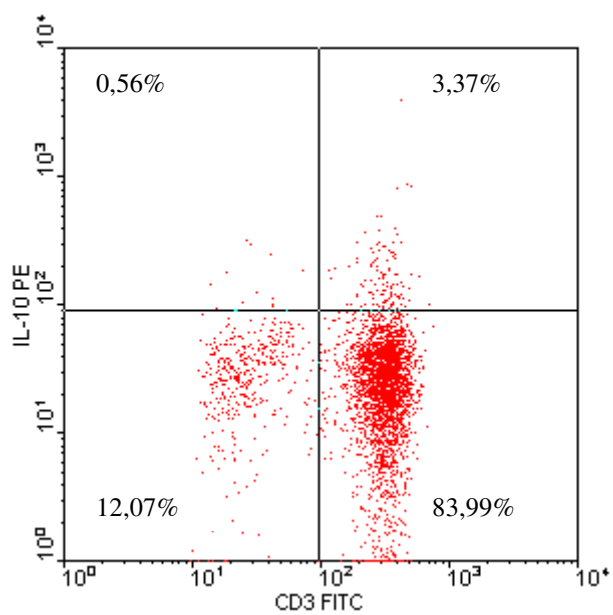


Figura 10. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD3 e anti-IL-10 em linfócitos após a cultura celular.



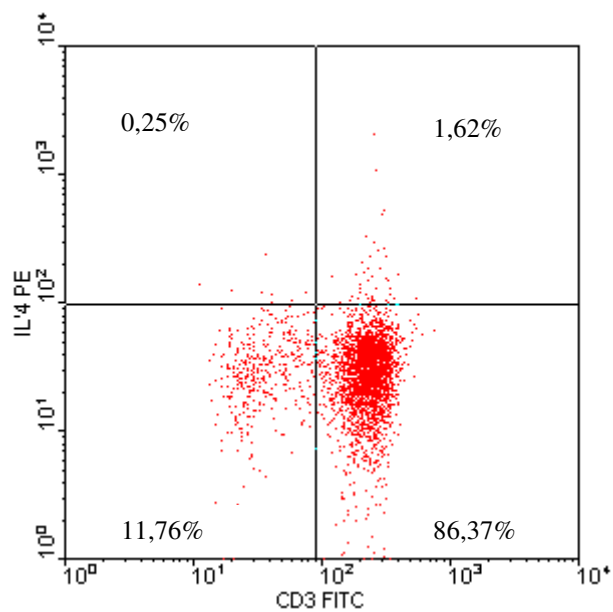


Figura 11. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD3 e anti-IL-4 em linfócitos após a cultura celular.

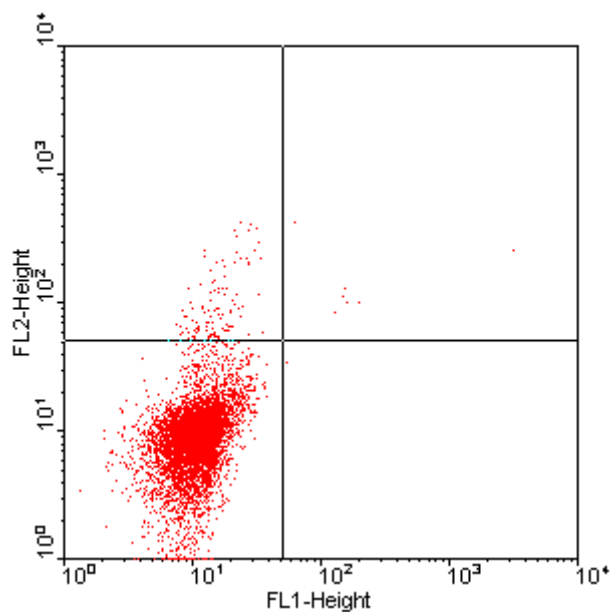


Figura 12. Controle isotípico para marcação de fluorescência não-específica (FL1 x FL2)

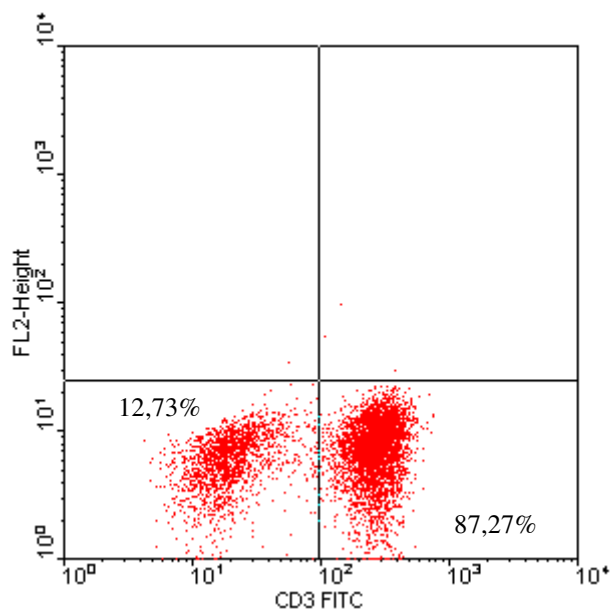


Figura 13. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD3 em linfócitos após a cultura celular.

### 6.3. Determinação do percentual de linfócitos CD3+ e dos subtipos CD4+, CD8+, CD26+ e CD4+/26+

Para a determinação percentual dos linfócitos CD3+ e dos subtipos linfocitários CD4, CD8, CD26 e CD4/26 por citometria de fluxo, 100µl de alíquotas do sangue total foram incubadas com os seguintes conjuntos de marcadores de superfície: 10µl de anticorpo monoclonal anti-CD3 (BD Pharmingen™, número do catálogo: 555332), 20 µl de anticorpo monoclonal *Tritest* anti-CD3 PerCP/anti-CD4 FITC/anti-CD8 PE (BD Pharmingen™, número do catálogo: 340298) ou anti-CD4 FITC/anti-CD8 PE (FK Biotec, número de catálogo, FP306), 10 µl de anti-CD4 FITC (IQP-Products, número do catálogo: IQP 535F) e 10 µl anti-CD26 PE (BD Pharmingen™, número do catálogo: 340423). Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente no escuro, adicionou-se 450 µl de solução de lise diluída (*FACS Lysing Solution*, BD Pharmingen™, número do catálogo: 349200). A seguir, incubou-se por mais 20 minutos no escuro à temperatura ambiente; os tubos contendo as amostras de suspensão

celular foram lavados duas vezes com tampão PBS resfriado diluído em soro fetal bovino 1% e ressuspensas com 500 µl de solução de paraformaldeído 1%. Um tubo contendo anticorpo monoclonal para avaliação das fluorescências PE e FITC inespecíficas *Simultest™ Control*  $\gamma 1/\gamma 2a$ (BD-Pharmlingen, número do catálogo: 340041) foi também incluído.

Vinte mil eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson) e analisados com auxílio do software WinMdi versão 2.8.

Para a análise, os linfócitos foram selecionados de acordo com suas características de tamanho e granulosidade, conforme a Figura 14. Os gráficos para a correlação entre as fluorescências FL1(CD4-FITC) X FL2 (CD8-PE), FL1 (FITC CD4) X FL2 (CD26 PE), bem como a análise do controle isotópico (Figura 17) está exemplificada nas Figuras 15, 16. O percentual de células CD26+ foi determinado considerando-se o total de marcação positiva FL2 a partir da análise dos plots de análise referente à marcação CD4/CD26.

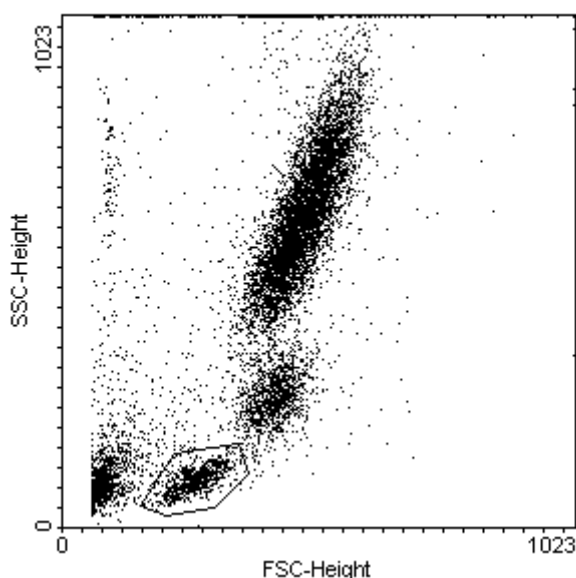


Figura 14. Seleção da população linfocitária de sangue periférico de acordo com as características de tamanho e granulosidade.

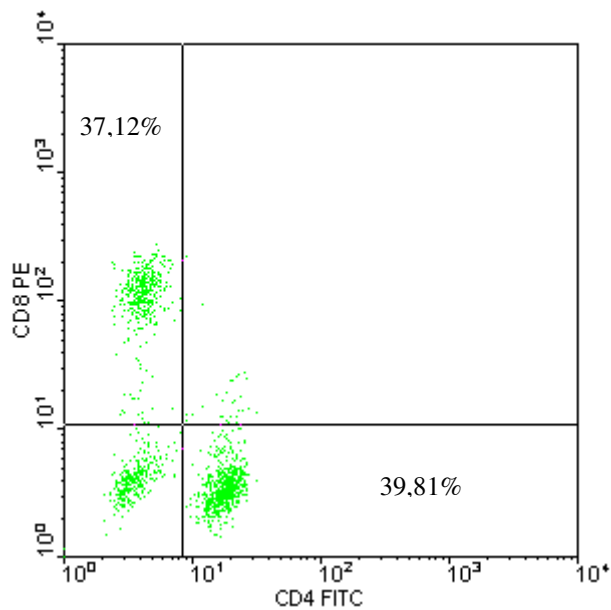


Figura 15. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti-CD8 em linfócitos de sangue periférico.

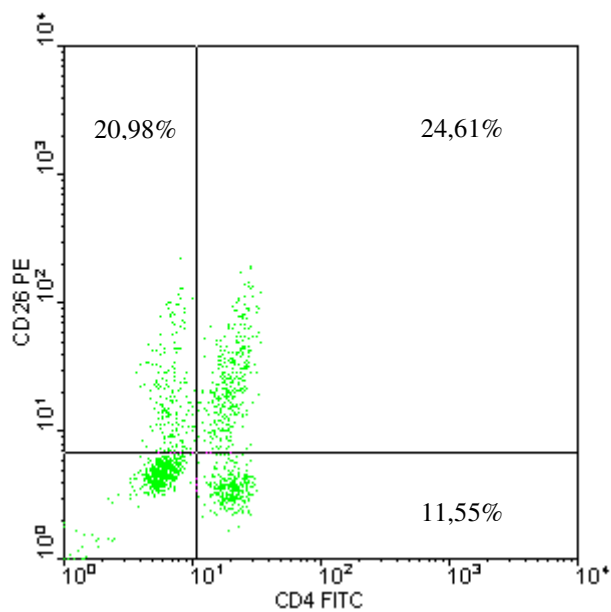


Figura 16. Gráfico em *dot plot* exemplificando a expressão de anti-CD4 e anti-CD26 em linfócitos de sangue periférico.

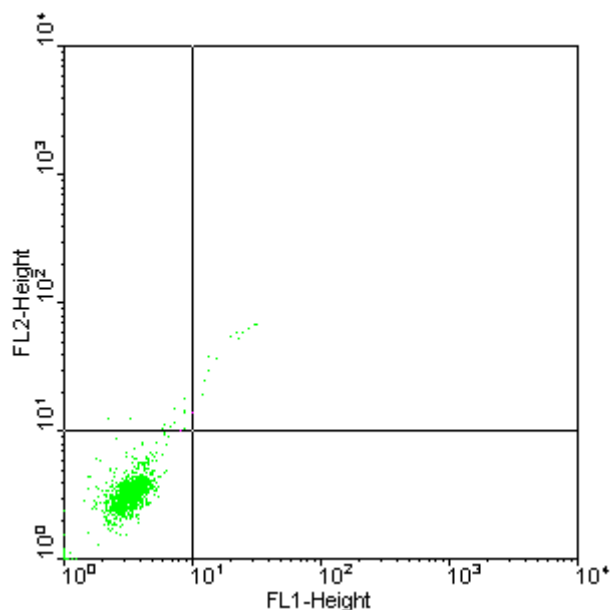


Figura 17. Controle isotópico para marcação de fluorescência não-específica (FL1 x FL2)

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos foram apresentados como média e desvio padrão e comparados entre os grupos usando-se o teste  $t$  de Student. Os dados assimétricos foram descritos através da mediana e valores mínimos e máximos e comparados usando o teste U Mann-Whitney. Os dados categóricos foram expressos em números absolutos e percentuais e a significância estatística foi testada através do teste Qui-Quadrado ou teste Exato de Fisher. O nível de significância considerado foi de  $\alpha=0,05$ . Os dados foram analisados empregando-se o software SPSS versão 12, e o gráfico de dispersão de pontos apresentado no capítulo dos RESULTADOS foi confeccionado pelo software Sigma Plot versão 9.0.

## 8. CONSIDERAÇÕES SOBRE A LOGÍSTICA DO ESTUDO E FORMATO DA TESE

O Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde – Famed/PUCRS não exige um formato específico para a edição da tese. Assim, optou-se por empregar as recomendações de Spector (Spector, 2002). A forma através da qual as referências bibliográficas estão descritas ao longo desta tese seguiram as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) indicadas no texto por Sobrenome, Ano. Nas referências bibliográficas, os artigos utilizados estão citados em ordem alfabética.

Esta tese está descrita contendo os seguintes tópicos: Introdução, Hipótese, Objetivos, Pacientes e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Referências Bibliográficas e Anexos.

Este trabalho integra a linha de pesquisa do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS que investiga os distúrbios hipertensivos da gestação em colaboração com Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina e o Serviço de Obstetrícia do Hospital São Lucas da PUCRS.

A seleção, coleta das amostras sanguíneas para as análises laboratoriais e revisão dos prontuários das pacientes foi realizada pelos seguintes alunos de iniciação científica sob supervisão da Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa e Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo: Alexandre Agra, Antonella Furquim Conte, Daniele Escouto, Douglas Freitas, Fábio Asquidamini, Florência Ferreira Barreira, Giovana De Nardo Maffazioli, Gustavo Bordin, Henrique Oliani, João Paulo Leal Schambeck, Leandro Damiani, Mateus Alexandreti, Mariana Ambros, Marta Hentschke, Renata Farinon e Samantha Dieckel.

A autora realizou o processamento e as análises laboratoriais relacionadas ao citômetro de fluxo em conjunto com o Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias-IPB/PUCRS sob a supervisão da Dra. Denise Cantarelli Machado e auxílio de Silvana Lunardini Alves, e contou também com a colaboração do Laboratório de Imunogenética da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a coordenação da Dra. Nance Nardi para a leitura e análises em citometria no momento inicial do trabalho enquanto o citômetro do IPB-PUCRS esteve em manutenção técnica.

Os dados produzidos neste trabalho foram apresentados como tema livre no Salão de Iniciação Científica pela estudante Antonella Furquim Conte, pela autora sob a forma de poster Mostra de Pós-Graduação da PUCRS/2007, na VII Semana de Estudos Farmacêuticos - Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul/UNIJUI e pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo nos Seminários Anuais do PPSUS como parte do relatório do Fomento concedido via FAPERGS (Edital MS/CNPq/FAPERGS 008/2004).

O Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde preconiza que os pós-graduandos realizem como atividade obrigatória o estágio de docência em pesquisa. Para tanto, solicitou-se reaproveitamento, com êxito, das atividades de docência realizadas durante o período de realização do Mestrado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde-Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A assessoria bioestatística foi realizada pelo Dr. Mário Bernardes Wagner.

É relevante ressaltar que o presente grupo de pesquisa dispõe de um Ambulatório de Nefrologia/Hipertensão Gestacional vinculado às atividades docentes do Serviço de Nefrologia, do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Este ambulatório realiza suas atividades às quintas-feiras, no conjunto 305 do Hospital São Lucas da PUCRS, sob coordenação do Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo e supervisão clínica do Dr. Giovani Gadonski e Dra. Ioná Rosine Scolari Conceição. O Ambulatório de Nefrologia/Hipertensão Gestacional assiste às pacientes que apresentaram quadro de Doença Hipertensiva Gestacional atendidas no centro Obstétrico do Hospital São Lucas da PUCRS. Após a alta hospitalar, as pacientes são convidadas a retornarem para o referido ambulatório para uma consulta inicial e

consultas de retorno; em cada momento, protocolos padronizados pelo grupo contendo informações relacionadas aos desfechos relevantes após o parto são preenchidos pelos médicos supervisores em conjunto com os acadêmicos de Medicina e cadastrados em um banco de dados armazenados no programa Acess. O Ambulatório de Nefrologia/Doença Hipertensiva Gestacional iniciou suas atividades em novembro de 2003. Até o momento, cerca de 140 pacientes foram contempladas com este serviço, dentre as quais estão incluídas as participantes do presente projeto. O Ambulatório representa um importante diferencial em nosso meio, pois além de prestar um acompanhamento clínico e laboratorial especializado a este grupo de pacientes, constitui uma importante atividade de vivência prática em clínica para os acadêmicos de Medicina que utilizam os dados coletados para trabalhos científicos apresentados no Salão de Iniciação Científica da PUCRS. Adicionalmente, os alunos do Programa de Pós-Graduação também podem valer-se destes dados para elaboração de teses e dissertações.

O grupo de pacientes com SPE pertencente a este trabalho foi definido com base na informação referente à pressão arterial e proteinúria na hora da coleta. Todas as pacientes SPE foram encaminhadas para o Ambulatório de estudos da Doença Hipertensiva Gestacional e até o presente momento nem todas foram avaliadas no pós-parto porque não completaram o período de 90 dias após o parto.



## RESULTADOS

### 1. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DOS GRUPOS ESTUDADOS.

Neste projeto participaram 52 gestantes: 26 no grupo GN e 26 no grupo SPE. No grupo GN foi excluída uma gestante. Sua amostra foi incluída durante o período gestacional (idade gestacional de aproximadamente 30 semanas). Quando se revisou o prontuário em busca dos dados perinatais como procedimento padrão para todas as pacientes incluídas nesta condição, foi verificado que a paciente havia desenvolvido pré-eclâmpsia e teve sua gestação interrompida devido a esta patologia. Assim, para fins de análise estatística, o grupo GN foi composto por 25 gestantes. Observa-se que todas as outras pacientes do grupo controle que ainda não chegaram ao termo da gestação (n=9), estão na iminência de, e até o momento conforme nosso acompanhamento, nenhuma gestante apresentou critério para ser excluída deste grupo.

A idade das pacientes não diferiu significativamente entre os grupos avaliados ( $p=0,749$ ). No grupo GN, a idade mínima foi de 17 anos e máxima de 39 anos e no grupo SPE a idade mínima foi 17 anos e a máxima foi de 41 anos.

A média da idade gestacional no momento da coleta da amostra sanguínea para o estudo não foi estatisticamente distinta entre os grupos ( $p=0,444$ ). No grupo GN a idade gestacional mínima foi de 21,7 semanas e a máxima foi de 41,3 semanas. Já no grupo SPE a idade gestacional variou entre 25,0 e 40,0 semanas.

Não observamos diferença quanto à distribuição das pacientes entre os grupos estudados em relação ao tipo racial, conforme mostrado na Tabela 1. A frequência de mulheres das raças mista e não-branca foi de 32% (n=8/25) nos dois grupos estudados.

Os valores pressóricos de PAS e PAD assim como a excreção urinária de proteínas, obtida através de mensurações em urina de 24 horas e também estimada através da relação proteína/creatinina em amostra aleatória de urina, foram significativamente maiores no grupo SPE em relação às gestantes normais conforme esperado.

Os grupos não foram distintos em relação à altura das pacientes. No entanto, as gestantes pré-eclâmpticas apresentaram peso maior; a variação de peso neste grupo foi de 57 à 132 kg e no grupo controle a variação foi de 53,6 à 85,4 kg. Os valores do índice de massa corporal calculados estão mostrados na Tabela 1.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto às dosagens séricas de creatinina, ácido úrico e glicemia de jejum. O mesmo equivaleu para as medidas de hematócrito, hemoglobina e contagem de plaquetas. Algumas pacientes no grupo SPE apresentavam a dosagem laboratorial de fibrinogênio plasmático conforme mostrado na Tabela 1. Algumas destas medidas não foram solicitadas durante a internação ou no acompanhamento ambulatorial, principalmente para as gestantes do grupo GN.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos grupos Gestação Normal e Síndrome de Pré-Eclâmpsia

	Gestação Normal (n= 25)	Síndrome de Pré-Eclâmpsia (n= 26)	P
Idade Gestacional (semanas)	32,5±7,2	33,8±3,8	0,444 <sup>a</sup>
Idade Materna (anos)	25,6±6,8	26,1±6,5	0,749 <sup>a</sup>
Pressão Sistólica (mmHg)	116,3±10,8	149,9±16,2	<0,001 <sup>a</sup>
Pressão Diastólica (mmHg)	74,2±10,2	96,5±17,6	<0,001 <sup>a</sup>
Cor da pele Branca n° (%)	17 (68)	17 (68)	0,158 <sup>b</sup>
Altura (cm)	160,8±6,6	160,6±6,5	0,895 <sup>a</sup>
IMC (peso/altura <sup>2</sup> )	27,7±3,1	32,9±7,8	0,003 <sup>a</sup>
Peso (kg)	70,6±9,2	84,9±20,2	0,002 <sup>a</sup>
Relação P/C	nd	0,4 (0,3 à 4,1)	
PRT 24 horas	nd	399 (52 à 4420)	
AU (mg%)	4,1±1,3	5,0±1,4	0,138 <sup>a</sup>
CR (mg%)	0,8±0,1	0,8±0,1	0,840 <sup>a</sup>
GLICJ (mg%)	77,3±27,5	77,6±7,5	0,968 <sup>a</sup>
Fibrinogênio	nd	435,8±73,6	
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μl)	212±54,2	207,3±44,1	0,803 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	34,9±2,9	35,8±3,6	0,376 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g%)	11,6±1,0	12,1±1,2	0,169 <sup>a</sup>

Dados apresentados como média±DP e mediana (mínimo a máximo) (a) teste t Student; IMC= Índice de Massa Corporal, P/C= relação proteinúria/creatininúria em urina de amostra; PRT 24 horas= proteinúria em urina de 24 horas; nd= não determinado; AU= ácido úrico sérico; CR=creatinina sérica.; GLICJ=Glicemia de jejum; Hct= hematócrito; Hb= hemoglobina.

A descrição da história médica progressa das pacientes pode ser visualizada na Tabela 2. A frequência do histórico de infecção do trato urinário não foi diferente entre os grupos estudados.

Aproximadamente o dobro de pacientes no grupo SPE em relação ao grupo GN relatou o histórico familiar de hipertensão (71% vs 38%); principalmente em familiares de primeiro

grau- pai, mãe ou irmãos- cuja frequência observada foi de 57% (12/21) no grupo SPE e de 33% (7/21) no grupo GN. A ocorrência de complicação em gestações anteriores por hipertensão foi observada somente no grupo SPE e o índice observado foi de 48% (12/25).

O percentual de primigestas nos grupos SPE e GN foi, respectivamente: (27%, 7/26 e 44%, 11/25,  $p=0,249$ ). O histórico de abortamento espontâneo relatado não foi diferente entre os grupos analisados: 39% (10/26) no grupo SPE e 28% (7/25) no grupo GN ( $p=0,555$ ). O percentual de mulheres não-nulíparas foi maior no grupo SPE (62%, 16/26) em comparação ao grupo GN (40%, 10/25) mesmo que a significância estatística seja desprezível ( $p=0,165$ ). As medianas do número de gestações, de abortos e de partos prévios entre os grupos bem como os respectivos valores mínimos e máximos estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Características clínicas e história médica obstétrica progressiva nos grupos Gestação Normal e Síndrome de Pré-Eclâmpsia

Característica	Gestação Normal		Síndrome de Pré-Eclâmpsia		P
	n		n		
Histórico de ITU	21	13 (62)	19	14 (74)	0,511 <sup>b</sup>
Histórico de HAS familiar	21	8 (38)	21	15 (71)	0,158 <sup>a</sup>
Parentesco 1º grau	21	7 (33)	21	12 (57)	0,158 <sup>a</sup>
Histórico de SPE	21	0 (0)	25	12 (48)	0,027 <sup>a</sup>
História Materna Obstétrica					
Nº gestações	25	2 (1 a 8)	26	2 (1 a 7)	0,383 <sup>c</sup>
Nº de abortos	25	0 (0 a 1)	26	0 (0 a 3)	0,504 <sup>c</sup>
Nº de partos	25	0 (0 a 4)	26	1 (0 a 5)	0,356 <sup>c</sup>

Dados apresentados como contagem (percentagem) e mediana (mínimo a máximo) (a) Teste qui-quadrado, (b) Teste exato de Fisher (c) Teste U Mann-Whitney

## 2. DISTRIBUIÇÃO LEUCOCITÁRIA EM SANGUE PERIFÉRICO NOS GRUPOS DE ESTUDO.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na contagem global de leucócitos entre os grupos de estudados. A leucometria no grupo GN variou entre 6.900-16.500 leucócitos/ $\mu$ l e, no grupo SPE, 6.900-16.100. A contagem média de linfomononucleares observada entre os grupos SPE e GN foi de, respectivamente,  $2.890\pm 668$  células/ul e  $2.484\pm 822$  células/ul, ( $p=0,079$ ).

A relação linfocitária CD4/CD8 no grupo SPE foi diferente ( $p=0,017$ ) em comparação ao grupo controle em virtude do número maior das células CD4+ ( $p=0,002$ ), conforme mostrado na Tabela 3 e Figura 18. Não foi observada diferença no percentual de linfócitos CD8+ entre os grupos de comparação.

O nível percentual médio de células linfomononucleares em amostras de sangue periférico expressando o marcador de superfície CD26+ não foi diferente neste estudo entre os grupos estudados assim como o número de células CD4+ co-expressando a molécula CD26.

Tabela 3. Leucometria e contagem dos subtipos linfocitários entre os grupos de estudo.

	Gestação Normal (n= 25)	Síndrome de Pré-Eclâmpsia (n= 26)	P
Leucócitos totais ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	10,2 $\pm$ 2,4	10,5 $\pm$ 2,4	0,758 <sup>a</sup>
Granulócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	7,8 $\pm$ 2,3	7,7 $\pm$ 1,9	0,916 <sup>a</sup>
Linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1,8 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,5	0,174 <sup>a</sup>
Monócitos	0,6 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3	0,104 <sup>a</sup>
CD3+ (%)	75,1 $\pm$ 9,2	74,3 $\pm$ 10,4	0,765 <sup>a</sup>
CD4+ (%)	37,8 $\pm$ 5,7	43,6 $\pm$ 5,8	0,002 <sup>a</sup>
CD8+ (%)	26,9 $\pm$ 7,3	23,7 $\pm$ 5,8	0,148 <sup>a</sup>
Razão CD4/CD8	1,5 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,5	0,017 <sup>a</sup>
CD26+ (%)	52,5 $\pm$ 8,7	49,5 $\pm$ 6,9	0,336 <sup>a</sup>
CD4+/CD26+ (%)	32,3 $\pm$ 7,0	30,8 $\pm$ 7,0	0,692 <sup>a</sup>

Dados apresentados como média $\pm$ D, (a) teste t de Student;

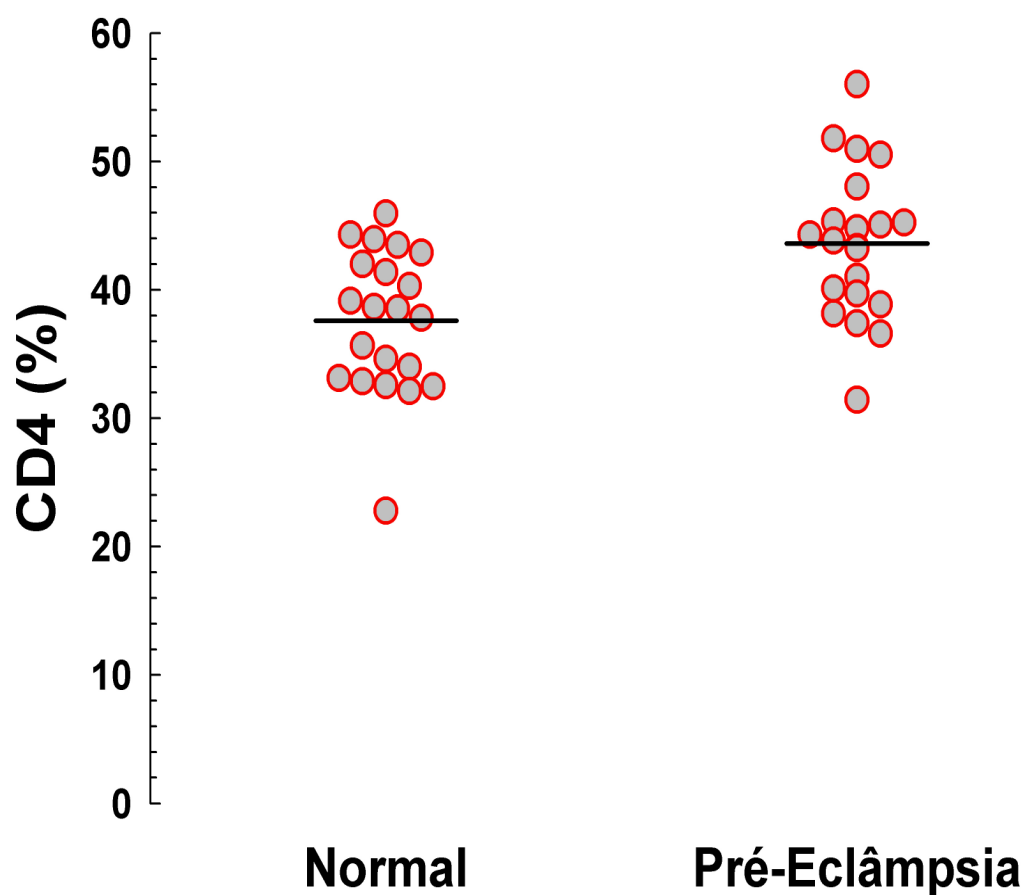


Figura 18. Gráfico de dispersão de pontos representando a distribuição dos linfócitos CD4+ nos grupos de estudo.

A distribuição de linfócitos com imunofenótipo T1 e T2 bem como as respectivas razões T1/T2 em amostras de sangue periférico não apresentaram diferenças entre os grupos de pacientes estudadas (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual dos linfócitos CD3+ com imunofenótipo de citocinas do tipo 1 e do tipo 2 em sangue periférico nos grupos de estudo.

Variável	Gestação Normal		Síndrome de Pré-Eclâmpsia		P <sup>a</sup>
	n	Valor	n	Valor	
IFN $\gamma$ /CD3+ (%)	25	13,5 (3,6 a 31,3)	26	11,7 (6,9 a 29,4)	0,855
IL-2/CD3+ (%)	3	16,0 (8,1 a 18,6)	3	19,5 (6,0 a 21,6)	na
IL-4/CD3+ (%)	25	1,9 (1,1-2,9)	26	1,9 (0,7 a 4,2)	0,687
IL-10/CD3+ (%)	25	2,8 (1,5 a 4,4)	26	3,1 (1,2-7,3)	0,259
IL-2/IL-10 (%)	3	5,8 (3,3 a 7,1)	3	10,4 (2,2 a 17,6)	na
IL-2/IL-4 (%)	3	6,5 (2,9-15,5)	3	8,8 (1,6 a 9,4)	na
IFN $\gamma$ /IL-4 (%)	25	11,1 (2,8 a 18,9)	26	5,4 (1,6 a 31,0)	0,400
IFN $\gamma$ /IL-10 (%)	25	4,3 (1,7-13,8)	26	3,3 (0,9 a 23,9)	0,569

Dados apresentados como mediana (mínimo a máximo), (a) teste U-Mann-Whitney. IFN $\gamma$ = Interferon gama; IL-2=interleucina 2; IL-10= interleucina 10; IL-4=interleucina 4 na= não aplicável

### 3. DADOS DO PARTO E DO RECÉM-NASCIDO

Os dados perinatais estão apresentados na Tabela 5. No grupo GN nem todos os dados foram obtidos até o presente momento. Neste grupo houve a inclusão de amostras durante o período gestacional, entretanto, 9 destas mulheres ainda não chegaram ao termo da gestação (até 25.01.2008). Já no grupo SPE, os dados perinatais referentes a uma paciente não foram obtidos pelo fato de que mesma ter apresentado alta hospitalar antes do parto.

A maioria dos partos no grupo SPE foi do tipo cesáreo (80%).

Os recém-nascidos das pacientes do grupo SPE apresentaram peso menor comparando-se com as gestantes controles ( $p < 0,001$ ). O peso da placenta no grupo SPE foi da mesma forma menor em relação ao grupo GN, mesmo que a diferença estatística não tenha sido alcançada ( $p > 0,05$ ). Os valores mínimos e máximos do peso da placenta nos grupos GN e SPE foram, respectivamente: 435 à 1120 gramas e 210 à 1065 gramas. Conforme esperado, os



valores de idade gestacional obstétrica e pediátrica foram significativamente menores no grupo SPE em relação ao grupo GN (Tabela 5).

Para ambos os grupos, houve predominância de recém-nascidos classificados como “Adequados para a Idade Gestação” conforme mostra a Tabela 5. No entanto a proporção de recém-nascidos “Pequenos para a Idade Gestacional” foi maior no grupo SPE em relação aos controles. As condições dos recém-nascidos, avaliados pelos valores do APGAR no primeiro e quinto minutos de vida, não foram distintos entre os grupos de estudo.

Tabela 5. Características do parto e do recém-nascido nos grupos de estudo.

Característica	Gestação Normal		Síndrome de Pré-Eclâmpsia		P
	n	Valor	n	Valor	
Parto Cesáreo n(%)	16	7 (44)	25	20 (80)	0,023 <sup>c</sup>
RN F n(%)	15	6 (40)	25	10 (40)	0,632 <sup>c</sup>
IGO	5	39,5±1,1	12	36,1±2,8	0,003 <sup>a</sup>
IGP	16	39,4±1,5	25	35,4±4,0	<0,001 <sup>a</sup>
APGAR 1	15	8,3±1,8	25	7,8±1,2	0,290 <sup>a</sup>
APGAR 5	15	9,3±1,1	25	9,1±0,7	0,365 <sup>a</sup>
Classificação do RN n(%)	15		25		0,330 <sup>b</sup>
AIG		12 (80)		19 (76)	
GIG		2 (13)		1 (4)	
PIG		1 (7)		5 (20)	
Peso RN (g)	15	3519±472	25	2647±906	<0,001 <sup>a</sup>
Peso da placenta (g)	13	681±158	24	619±212	0,336 <sup>a</sup>

Dados apresentados como contagem (percentagem) e média±DP.(a) Teste t de Student e (b) teste Qui-quadrado, (c) Teste exato de Fisher.. RN F= recém-nascido do sexo feminino; IGP= idade gestacional pediátrica em semanas; AIG= Adequado para a idade gestacional; GIG: grande para a idade gestacional; PIG: pequeno para a idade gestacional; APGAR 1= APGAR no primeiro minuto; APGAR 5= APGAR no quinto minuto; RN= recém-nascido

## DISCUSSAO

Considerando-se o potencial imunogênico do tecido fetal, uma resposta inflamatória sistêmica (RIS) leve a moderada envolvendo o sistema imunológico inato e adaptativo materno é documentada durante o curso da gestação fisiológica sem necessariamente representar doença materna ou rejeição ao feto. Na pré-eclâmpsia, a RIS da gestação normal também ocorre, porém em maior intensidade (Redman et al, 1999). Parâmetros laboratoriais imunológicos e hematológicos podem descrever esta condição inflamatória em leucócitos de sangue periférico (Sacks et al, 1998; Shamonki et al, 2007; Sargent et al, 2006; Sakai et al, 2004; Terrone et al, 2000). Dos marcadores laboratoriais de inflamação selecionados para este estudo, observou-se que o nível percentual dos linfócitos CD4+ foi maior nas gestantes com SPE em relação às gestantes controles normotensas. Nenhuma diferença no padrão de expressão de citocinas T1 (inflamatórias) e T2 (antiinflamatórias), ou na razão T1/T2 foi detectada entre os grupos de pacientes analisadas.

Na vigência do processo inflamatório, os linfócitos T auxiliares CD4+ apresentam um papel efetor central, já que uma vez ativados mediante contato antigênico CPH- classe II restrito, secretam as citocinas necessárias a sua proliferação e diferenciação, bem como a ativação dos linfócitos T-citotóxicos (CD8+) e das células apresentadoras de antígeno como os monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (Abbas & Lichtman, 2003).

Um padrão específico de citocinas secretado pelos linfócitos T-CD4+ é descrito como importante fator necessário à manutenção da sobrevivência da placenta e do feto contra eventuais reações dos leucócitos maternos imunocompetentes. A hipótese imunotrófica descrita por Wegmann e colaboradores sugere que o sucesso gestacional, sob o ponto de vista das reações imunológicas, está associado a um padrão dominante de citocinas antiinflamatórias Th2 (IL-4 e IL-10) (Wegmann et al, 1993), tanto na unidade feto-placentária (Saito, 2000) quanto no

sangue periférico materno (Holmes et al, 2003), já que estas citocinas apresentam a propriedade de reprimir as ações citotóxicas das citocinas Ta1. A importância do balanço das citocinas Ta1/Ta2 durante a gestação ganhou reforço a partir da observação clínica de que as gestantes com lúpus eritematoso-doença inflamatória mediada por imunocomplexos associada às citocinas Ta2 - apresentam exaltação dos sintomas, ao contrário das pacientes com artrite reumatóide – doença inflamatória associada às citocinas Ta1- que mostram remissão dos sintomas (Tchórzewski et al, 2000; Del Prete et al, 1994; Mecacci et al, 2007). Adicionalmente, a hipótese imunotrófica tornou-se ainda mais consistente a partir da observação de que certas complicações gestacionais, como o abortamento espontâneo de repetição e a Doença Hipertensiva Gestacional, estão associadas ao aumento da razão Ta1/Ta2 (Arriaga-Pizzano et al, 2005; Darmochwal-Kolaraz et al, 1999, Henessy et al, 1999; Rein et al, 2002; Saito et al, 1999).

Nesse estudo, entretanto, não foi possível associar à SPE um padrão sistêmico de citocinas T1 inflamatórias em comparação à gestação normotensa. Em parte, tal discordância pode ser justificada pela metodologia de medida empregada por alguns autores para tal inferência. Dong e colaboradores associaram a maior concentração sérica das citocinas IL-2 e TNF $\alpha$  ao padrão Ta1 dominante em gestantes pré-eclâmpticas (Dong & Wang, 2005). Arriaga-Pizzano e colaboradores, da mesma forma, associaram o fenótipo Ta1 às gestantes com pré-eclâmpsia pela maior concentração de IFN $\gamma$  plasmático (Arriaga-Pizzano et al, 2005). Entretanto, a expressão intracelular da mesma citocina, determinada por marcação intracitoplasmática em linfócitos, não foi distinta comparando-se às gestantes normotensas no estudo citado. A dicotomia T1 ou T2, inicialmente descrita nos linfócitos CD4+ e posteriormente também observada em outras células imunes, representa a propriedade que certos tipos celulares específicos possuem de participar da inflamação ou de reprimi-la através da secreção de citocinas. As dosagens séricas não permitem avaliar o tipo celular secretor de citocinas, uma vez que outras células presentes ou em contato com a corrente circulatória de

natureza não-imune (como as células epiteliais e os fibroblastos) também produzem citocinas. Além disso, a determinação sérica das citocinas pode ser afetada por fatores tais como a ligação aos seus receptores solúveis específicos, a excreção urinária e a sua captação para consumo celular, o que é especialmente relevante para a avaliação das citocinas T2 já que a sua proporção é muito menor em comparação às T1 (Jason et al, 2001). Dessa forma, a quantificação sérica ou plasmática das citocinas representa uma maneira indireta e metodologicamente menos sensível para a inferência da condição inflamatória. Também, deve-se considerar que as citocinas funcionam a nível intracelular, e, portanto a marcação intracitoplasmática representaria a avaliação mais direta do seu papel biológico e também o mais próximo da definição Ta1/Ta2, pois considera a marcação de superfície celular simultaneamente. Finalmente, a correlação entre a concentração sérica ou plasmática das citocinas e a sua expressão intracelular ainda não está totalmente estabelecida na pré-eclâmpsia pois poucos estudos fazem essa avaliação simultaneamente. (Arriaga-Pizzano et al, 2005; Saito et al, 1999a)

A possibilidade de se acessar o perfil de citocinas nas diferentes células imunes é fundamental para o entendimento da regulação imune normal e também a sua disfunção nas doenças. Com o avanço das técnicas de fixação e permeabilização celular, tornou-se possível identificar individualmente as células produtoras de citocinas. A marcação intracitoplasmática e a conseqüente leitura por citometria de fluxo permitem o conhecimento do fenótipo celular e avaliação de um grande número de células. No entanto, a detecção de citocinas nas células em repouso é mínima (Sewell et al, 1997; Sacks e Sargent, 2003), e a maioria das técnicas publicadas nesse sentido utilizam substâncias que representam um forte estímulo fisiológico em cultura para demonstrar o potencial de síntese de cada célula (Pala et al, 2000; Sewell et al, 1997; Prussin e Metcalfe, 1995). O protocolo experimental utilizado nesse trabalho para a ativação artificial das células T humanas utilizou as substâncias PMA e ionomicina que permite a ativação linfocitária, respectivamente, via mobilização da piruvato quinase C

intracelular e através do influxo de cálcio extracelular. Entretanto, observamos que a marcação de superfície anti-CD4, nessas condições, foi fortemente diminuída, o que impossibilitou a avaliação Ta1 e Ta2 nessa população. Anderson e colaboradores observaram que quando as células T são expostas à combinação PMA + ionomicina cálcica, a expressão do CD4 de superfície reduz-se em aproximadamente 90% entre um período de incubação de 4-6 horas, e que permanece neste nível de expressão por 24 horas com mínima re-expressão (Anderson & Coleclough, 1993). Esta limitação particularmente importante ao CD4 também foi observada por nós e demonstrada em outros estudos (Petersen et al, 1992, Sacks & Sargent, 2003). Alguns autores sugerem que a detecção de citocinas intracitoplasmáticas nos linfócitos T-CD4+ pelo protocolo mencionado pode ser indiretamente estimada na população CD8-/CD3+ (Prussin & Metcalfe, 1995). Neste estudo, entretanto, optamos pela avaliação considerando a marcação de superfície anti-CD3 que mostrou mínima influência pelo coquetel de estimulação utilizado. Além disso, entendemos que a possível presença das células com o imunofenótipo CD3+/CD4-/CD8- poderia influenciar a estimativa na população CD8-/CD3+.

Os estudos que empregam a citometria de fluxo para evidenciar a má-adaptação imune a favor da condição inflamatória na pré-eclâmpsia geralmente consideram a subpopulação de linfócitos CD4+ (Saito et al, 1999; Darmochwal-Kolaraz et al, 2002). Dada sugestão de que a fração linfocitária CD4+ expressa o fenótipo Ta1 aumentado na pré-eclâmpsia e, também, pela impossibilidade técnica de obtenção das células CD4+ após a cultura celular, um dos objetivos do presente estudo foi de avaliar se o comportamento linfocitário para a expressão das citocinas poderia igualmente estar alterado em comparação ao grupo controle nos linfócitos T CD3+.

Em relação ao tipo de população linfocitária, a inexistência de alterações significantivas no padrão T1 e T2 observada neste estudo concorda com os resultados obtidos

por Shi e colaboradores. Estes autores avaliaram mulheres no primeiro trimestre gestacional e não grávidas, e observaram que a expressão de IFN $\gamma$  nas células com imuno-fenótipo CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> (células matadoras naturais, *NK cells*) e na respectiva subpopulação que expressa marcadores de linfócitos T (*NK-T cells*, CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>) foi menor no grupo de mulheres gestantes em comparação às não grávidas. Interessantemente, o número das células matadoras naturais foi maior na corrente circulatória das gestantes. De acordo com os autores, a modulação do processo inflamatório sistêmico induzido pela gestação, no que diz respeito às citocinas secretadas, pode estar associada à atividade das células do sistema imune inato CD3<sup>-</sup> ao invés das células do sistema imune adaptativo que são CD3<sup>+</sup> (Shi et al, 2007).

Na pré-eclâmpsia, a falta de alterações sistêmicas na razão Ta1/Ta2 em linfócitos CD4<sup>+</sup> ou na razão Tc1/Tc2 em linfócitos com imunofenótipo CD8<sup>+</sup>, em comparação às pacientes não grávidas e às gestantes normais, também foi recentemente descrita (Borzychowski et al, 2005). No entanto, as razões leucocitárias NK1/NK2 e NK-T1/NK-T2 no grupo pré-eclâmpsia foram maiores em comparação às gestantes normais; novamente, a sugestão para o envolvimento preferencial das células inatas na Doença Hipertensiva Gestacional. Como os linfócitos Ta-CD4<sup>+</sup> e Tc-CD8<sup>+</sup> co-expressam o marcador pan-linfocitário CD3<sup>+</sup>, os nossos resultados podem ser comparados ao estudo citado.

Assim como recentemente proposto (Borzychowski et al, 2006; Chaouat et al, 2002), nossos resultados reafirmam a necessidade de questionar o paradigma Ta1/Ta2. O conceito precisa, portanto, ser expandido a outros tipos celulares do sistema imune inato que também apresentam a mesma polaridade funcional como às células matadoras naturais (Shi et al, 2007), além dos linfócitos T citotóxicos (Cerwenka et al, 1998). Mesmo que o número percentual de células CD3<sup>-</sup> não tenha sido diferente entre os grupos avaliados nesse estudo (dado não mostrado), não podemos excluir alterações no padrão de citocinas nas CD3<sup>-</sup> das pacientes com pré-eclâmpsia como sugerem os trabalhos de Borzychowski e colaboradores

(2005) e Shi e colaboradores (2007). Dada a heterogeneidade das células imunes, em especial na população de linfócitos T, um melhor conhecimento de outras fontes de secreção das citocinas do tipo 1 e do tipo 2 circulatórias, bem como dos seus fatores estimulantes, como o estudo das citocinas com atividade regulatória para a definição do fenótipo T1 ou T2 como a IL-12 e IL-18 (Sakai et al, 2004), poderá ser mais relevante diante de um contexto complexo e multifatorial como é a síndrome de pré-eclâmpsia, tanto para fins de diagnóstico quanto para o surgimento de possíveis alvos terapêuticos.

O fato de que estudos recentes, incluindo o nosso, não reproduzem a predominância das citocinas T1 na pré-eclâmpsia em relação à gestação normal, fazem com que novas especulações a respeito da hipótese imunotrófica surjam. Sargent e colaboradores sugerem que, embora a maior produção de citocinas do tipo 2 possa ser observada durante a gestação, não existe evidência concreta de que isto seja essencial para a manutenção da mesma, uma vez que esse desvio pode representar uma resposta secundária ao estado hormonal (Sargent et al, 2006). O questionamento quanto a dependência das citocinas do tipo 2 na gestação normal também deve considerar o estudo experimental em que fêmeas geneticamente modificadas para não expressarem os genes para 4 citocinas T<sub>2</sub> (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) não apresentaram perda fetal nem redução de sobrevivência neonatal da prole, tanto nos modelos de gestação singênica quanto a alogênica (Fallon et al, 2002). O questionamento parece ser pertinente também à pré-eclâmpsia. Hayakawa e colaboradoras observaram que a transferência adotiva de esplenócitos ativados expressando o fenótipo de citocinas do tipo 1 (IL-12+), provenientes de cobaias BALB/C virgens para cobaias fêmeas grávidas da mesma espécie após acasalamento com cobaias C57BL/6, desenvolveram hipertensão e proteinúria, fato que não foi observado nas cobaias não-grávidas. Entretanto, a transferência adotiva, nas mesmas condições, dos esplenócitos com o fenótipo de citocinas do tipo 2 (IL-4+), também resultou nos sintomas de pré-eclâmpsia. E a transferência das células com ambos fenótipos resultaram na expressão mais severa dos sintomas. Os autores propõem que outros mecanismos imunes,

além da rejeição celular, como a resposta humoral, podem contribuir para a fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Hayakawa et al, 2000). Além disso, a presença de anticorpos anti-fosfolípídeos é observada em alguns casos da doença (Mitsui et al, 2005). Considerando-se que estes anticorpos são capazes de induzir disfunção endotelial e diminuir a capacidade de invasão do trofoblasto (Arakawa al, 1997), não se pode excluir a possibilidade de que a resposta T2 possa estar associada à fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

Diante de tais observações, atualmente, o paradigma T1 e T2 é um assunto controverso e considerado uma simplificação das reações imunológicas para explicar o sucesso gestacional. A ausência de um padrão específico observado nesse estudo não exclui o envolvimento das citocinas na pré-eclâmpsia, mas sugere que a modulação T1 e T2 ocorra em tipos celulares específicos. É possível que a expressão de citocinas T1 e T2 em linfócitos totais CD3+ mostre distinção apenas nos casos graves de pré-eclâmpsia, como eclâmpsia ou síndrome HELLP.

A contagem elevada de leucócitos parece estar presente em alguns casos de pré-eclâmpsia. Terrone e colaboradores observaram que a leucocitose e a severidade da síndrome HELLP são proporcionais (Terrone et al, 2000). Ozkaya e colaboradores propuseram que a leucocitose acima de 16000 células/ul em pacientes pré-eclâmplicas hospitalizadas e que não receberam tratamento com sulfato de magnésio representou um importante fator de risco independente para a evolução a eclâmpsia (Ozkaya et al, 2006). Apesar das evidências, no presente estudo não foi constatado que a rede inflamatória sistêmica estivesse estimulada na pré-eclâmpsia em função da contagem leucocitária. Nenhuma das gestantes hipertensas avaliadas desenvolveu desfechos tão acentuados como plaquetopenia, eclâmpsia ou a síndrome HELLP, o que possivelmente justifique a ausência de diferenças para essa variável nos nossos resultados.



Modificações na distribuição linfocitária sanguínea CD4/CD8 fazem parte do processo de adaptação imune durante a gravidez. Watanabe e colaboradores, através de análises por citometria de fluxo com 2 cores, observaram que a contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ diminui no terceiro e no primeiro trimestre gestacional, respectivamente. Os autores propõem que essas modificações nas contagens linfocitárias observadas podem estar relacionadas aos mecanismos de aceitação ou rejeição do feto (Watanabe et al, 1996). No nosso estudo, o nível aumentado dos linfócitos CD4+ foi observado no grupo síndrome de pré-eclâmpsia e o mesmo também foi demonstrado por Dimitrakova-Dzhambazova e colaboradores (Dimitrakova-Dzhambazova et al, 2005). A contagem dos linfócitos CD4+ circulantes parece estar relacionada com a patogênese da pré-eclâmpsia, pois foi observado que a incidência de pré-eclâmpsia em gestantes HIV-1 positivas é menor no grupo que não utiliza terapia anti-retroviral em comparação com àquelas que apresentam restauração imunológica; este efeito parece estar diretamente relacionado à magnitude do tratamento (Wimalasundera et al, 2002).

A expressão aumentada de marcadores de ativação em granulócitos e monócitos de sangue periférico como o CD11b (sub-unidade  $\alpha$ M da integrina que media a adesão leucocitária ao endotélio vascular pois se liga molécula de adesão intercelular, CD54) e o CD62L em monócitos (L-seletina, media a ligação de baixa-afinidade dos leucócitos ao endotélio), como parte integrante da resposta inflamatória sistêmica, é descrita na pré-eclâmpsia (Sacks et al, 1998; Gervasi et al, 2001). Dessa forma, investigamos se a expressão linfocitária anti-CD26+ poderia estar igualmente aumentada na síndrome de pré-eclâmpsia. O CD26 representa uma enzima de superfície linfocitária denominada dipeptidil-peptidase IV envolvida no transporte intracelular de aminoácidos. Alguns estudos sugerem que a expressão do CD26+ possa definir o fenótipo T1 entre os linfócitos T com secreção de INF $\gamma$  aumentada (Willheim et al, 1997). No entanto, não foi possível observarmos diferenças no percentual de células linfomononucleares CD26+ entre os grupos, o que concorda com o fenótipo de citocinas T1 e T2 observado. Mesmo na população CD4+, a expressão de CD26 não foi

diferente entre os grupos, o que sugere, indiretamente, que a secreção de  $\text{INF}\gamma$  pela população linfocitária  $\text{CD3}^+$  não seja distinta entre os grupos da mesma forma que os estudos que empregam a marcação de superfície  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$  mostram (Arriaga-Pizano et al, 2005; Darmochwal-Kolaraz et al., 2002). No entanto, como a expressão aumentada de  $\text{INF}\gamma$  na pré-eclâmpsia foi demonstrada nas células  $\text{CD3}^-$  (Borzychowski et al 2005; Shi et al 2007), é possível que seja atribuída a essa população celular a co-expressão anti- $\text{CD26}$  igualmente elevada. Como a quantificação das células com imunofenótipo  $\text{CD3}^-/\text{CD26}^+$  não está descrita na pré-eclâmpsia, essa hipótese pode ser considerada.

Embora não tenha sido observada a diferença de expressão do  $\text{CD26}$  na gestação normal e com pré-eclâmpsia como marcador de ativação linfocitária sistêmico, o seu envolvimento no processo inflamatório local é documentado. Sehmsdorf e colaboradores associaram a presença do número percentual elevado de células mononucleares  $\text{CD26}^+$  e dos linfócitos  $\text{Ta1}$  deciduais em mulheres com abortamento espontâneo (Sehmsdorf et al ,2004). No entanto, a mesma associação não foi observada no sangue periférico mesmo considerando-se as populações  $\text{CD3}^+/\text{CD26}^+$ ,  $\text{CD4}^+/\text{CD26}^+$  and  $\text{CD8}^+/\text{CD26}^+$ . Já que a síndrome de pré-eclâmpsia e o abortamento espontâneo podem apresentar semelhanças relativas a aspectos imunológicos (Wilczynski, 2006), é possível que exista uma relação entre a expressão anti- $\text{CD26}$  e linfócitos  $\text{T1}$  no processo inflamatório placentário.

De acordo com Saito e colaboradores, durante a primeira gestação um estado de tolerância materna específica aos antígenos paternos é gerada, e na gestação seguinte o clone de células  $\text{T}$  de memória tolerantes rapidamente se expande, resultando em menor chance de má-adaptação imunológica da mãe ao feto, e conseqüentemente diminui o risco de pré-eclâmpsia (Saito et al, 2007). Nesse contexto, a idéia do reconhecimento prévio dos antígenos fetais pelas células imunocompetentes da mãe é reforçada pela observação epidemiológica de que a pré-eclâmpsia ocorre mais frequentemente em mulheres nulíparas e primigestas

(Robillard et al, 1993). A maioria das pacientes gestantes incluídas no presente estudo eram multigestas o que pressupõem a presença de exposição anterior ao tecido fetal, fato que também pode ser considerado quanto à ausência de um padrão inflamatório específico de citocinas nos linfócitos totais. É possível que a má-adaptação imune presente nas pacientes pré-eclâmpicas desse estudo, expressa pelo aumento dos níveis dos linfócitos CD4+, possa estar relacionada aos fatores constitucionais/genéticos-como a obesidade, histórico de pré-eclâmpsia e de hipertensão familiar - nos quais a elevação do CD4+ também está presente (Womack et al, 2007). Dessa forma, a modulação imunológica possivelmente induzida pela gestação na contagem de CD4+, em relação ao período pré-gestacional, torna-se mais difícil de ocorrer contribuindo, dessa maneira, para o quadro inflamatório exarcebado presente nesta doença. Portanto, a presença dos fatores constitucionais preexistentes que contribuem para uma sensibilização do sistema imunológico pode explicar os resultados obtidos. De acordo com a hipótese de Ness & Roberts, posteriormente apoiada por Redman & Sargent, a doença referida como “pré-eclâmpsia materna” envolve mulheres em torno dos 30 anos de idade, com tendência à obesidade e que desenvolvem a doença próxima do termo (Ness & Roberts, 1996; Redman & Sargent, 2005). As pacientes o grupo SPE presentes neste estudo apresentaram características semelhante e, também, indicação de sucesso reprodutivo tal como as gestantes controles. É possível, portanto, que a má-adaptação imune observada anteceda o evento gestação.

Os dados do presente trabalho mostram que a percentagem de células CD4 está aumentada na pré-eclâmpsia em comparação com a gestação normal, e que não se encontrou diferença na expressão de citocinas T1 e T2, e na relação T1/T2, usando citometria de fluxo. A mudança do perfil de citocinas do tipo 1/tipo 2 descrita anteriormente na síndrome de pré-eclâmpsia não foi detectada em células CD3+, e é possível que esteja presente em outros tipos celulares. O aumento de células CD4+ pode estar associado a resposta inflamatória sistêmica da pré-eclâmpsia.

## CONCLUSÕES

No presente estudo verificamos que em gestantes no terceiro trimestre de gestação com e sem pré-eclâmpsia assistidas no Hospital São Lucas da PUCRS:

- O perfil imunológico de produção de citocinas intracitoplasmáticas na população total de linfócitos T T1/T2 não foi diferente entre as gestantes normais e com síndrome de pré-eclâmpsia;

- A proporção de subtipo linfocitário CD4 foi maior em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia do que nas gestantes normais;

- A distribuição dos subtipos linfocitários CD3+, CD8+, CD26+ e CD4+CD26+ não foi diferente nos dois grupos em estudo.

Concluimos que o presente estudo não confirma a hipótese de que resposta inflamatória na pré-eclâmpsia favorece o perfil T1 sobre o perfil T2 em linfócitos totais, e que o aumento de células CD4 pode estar associado à resposta inflamatória sistêmica da pré-eclâmpsia.

O presente estudo sugere que deva ser avaliada a possibilidade de que o perfil de citocinas T1, anteriormente descrito na pré-eclâmpsia, possa ser predominantemente por células do sistema inato (NK).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Lichtman A. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition Ed. Saunders, pages. 298-317.

Al-Shammri S, Rawoot P, Azizieh F, AbuQooramr, Hanna M, Saminatha TR, Raghupathy R. Th1/Th2 cytokine patterns and clinical profiles during and after pregnancy in women with multiple sclerosis. Journal of Neurological Sciences 2004; 222:21-27

Anderson S, Coleclough C. Regulation of CD4 and CD8 expression on mouse T cells. Journal of Immunology 1993;151(10):5123-5134

Arakawa M, Takakuwa K, Honda K, Tamura M, Kurabayashi T, Tanaka K. Suppressive effect of anticardiolipin antibody on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. Fertility and sterility 1997;71:1103-1107

Arriaga-Pizzano L, Jimenez -Zamudio L, Vadillo-Ortega F, Martinez-Flores A, Herrerias-Canedo T, Hernandez-Guerrero C. The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the choriodecidual and fetal compartments. Journal of the Society for Gynecologic Investigation 2005;12(5):335-342

Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL & Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *The Journal of Pediatrics* 1991;119:417-423

Borzychowski AM, Croy BA, Chan WL, Redman CWG, Sargent, I. Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells. *European Journal of Immunology* 2005;35:3054-3063

Borzychowski AM, Sargent CWG, Redman CWG. Inflammation and pre-eclampsia. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2006; 11:309-316

Carter L, Swain S. Single cell analysis of cytokine production. *Current Opinion in Immunology* 1997;9:177-182

Cerneca F, Ricci G, Simeone R, Malisano M, Alberico S, Guaschino S. Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1997;73:31-36

Cerwenka A, Carter LL, Reome JB, Swain SL, Dutton RW. In vivo persistence of CD8 polarized T cell subsets producing Type 1 or Type 2 cytokines. *Journal of Immunology* 1998; 161:97-105

Chamley L. Antiphospholipid antibodies: biological basis and prospects for treatment. *Journal of Reproductive Immunology* 2002;57:185-202

Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Delage -Lappree G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1:Th2 dichotomy. *Journal of Reproductive Immunology* 2002; 53:241-256

Cockell A, Smarason A, Sargent I, Redman C, Poston L. Human placental syncytiotrophoblast microvillous membranes impair maternal vascular endothelial function. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1997;104:235-240,

Darmochwal-Kolaraz D, Gorzelak-Lesczynska B, Rolinski J, Oleszczuk J. T helper-1 and T helper-2 type cytokine imbalance in pregnant womem with preeclampsia. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 1999;86:165-170

Darmochwal-Kolaraz D, Rolinski J, Lesczynska-Gorzelack B. Oleszczuk J. The expression of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *American Journal of Reproductive Immunology* 2002; 48:381-386

Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1998; 179:1359-1375

Del Prete G, D'Elios. Th1/Th2 balance in human disease. Transplantation Proceedings 1998;30:2373-2377

Dimitrakova-Dzhambazova E, Milchev N, Pavlov P, Dimitrakov D. Lymphocyte populations and subpopulations in peripheral blood of pregnant women with pre-eclampsia. Akusherstvo i Ginekologija 2005; 44(1):40-4 (abstract)

Dong M, Wang J. Serum T helper 1 and 2 type cytokines in preeclampsia International. Journal of Gynecology and Obstetrics 2005; 89: 288-290

Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. British Journal of Medicine 2005;330: 565-571

Hemograma. Manual de Interpretação. Renato Falace, 2003. Artmed

Fallon P, Joli H, Smith P, Emson C, Townsend M, Fallon R, Smith P, McKenzie A. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9 and IL-13. Immunity 2002;17:7-17

Flow Cytometry Laboratory. Disponível em: <http://www.facsclab.unibe.ch/flow.html>. Acesso em 03.01.2008)



Galão AO, Pinheiro da Costa BE, d Ávila DO, Poli de Figueiredo CE. Transporte eritrocitário de La-arginina na gestação e período pós-parto. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2001;23(3):192 (abstract)

Germain S.J, Knight M, Sooranna SR, Redman CWG, Sargent IL. Interaction of circulating syncytiotrophoblast microvillous fragments with maternal monocytes in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2002a; 9 (suppl.): 259A (abstract)

Germain S, Redman C. C-reactive protein and the maternal inflammatory response in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Hypertension in Pregnancy* 2002;21(Suppl): 150 (abstract)

Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E, Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2001;185(4):792-796

Gifford et al Report of the National High Blood Pressure Education Program - Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2000;183: S1-S22

González-Quintero V, Jy W, Mauro L, Hortman L, O'Sullivan M, Ahn Y. Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2003;589-593

Granger J, Alexander B, Bennett W, Khalil R. Pathophysiology of Pregnancy-Induced Hypertension. *American Journal of Hypertension* 2001; 14:178S-185S

Hayakawa S, Fujikawa T, Fukuoka H, Chisima F, Karasaki-Suzuli M, Ohkoshi E, Ohi H, Fuji TK, Tochigi M, Satoh K, Shimizu N, Nishinarita S, Nemoto N, Sakurai I. Murine fetal resorption and experimental pre-eclampsia are induced by both excessive Th1 and Th2 activation. *Journal of Reproductive Immunology* 2000;47: 121-138

Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *Journal of Immunology* 1999; 163: 3491-3495

Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA -C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *The Journal of Experimental Medicine* 2004;200:957-965

Holmes VA, Wallace .JMW, Gilmore WS, McFaul P, Alexander HD. Plasma levels of the immunomodulatory cytokine interleukin-10 during normal human pregnancy: a longitudinal study. *Cytokine* 2003; 21:265-269

Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi, H, Laog-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either

preeclampsia or uterine growth retardation. American Journal of Obstetric and Gynecology 2002; 186:158-166

Jason J, Archibald L, Nwanyanwu O, Byrd M, Kazembe P, Dobbie H, Jarvis, W. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 2001;Nov:1097-1103

Jonsson Y, Ekerfelt C, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Matthiesen L. Systemic Th1/Th2 cytokine responses to paternal and vaccination antigens in preeclampsia: No differences compared with normal pregnancy. American Journal of Reproductive Immunology 2004;51:302-310

Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu A, Look PFA. WHO analysis of causes of maternal death: a systemic review. Lancet 2006; 36;1066-74.

Knight M, Linton E, Sargent I. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. British Journal of Obstetrics and Gynaecology 1998;105:632-640

Lidstrom C, Maththiesen L, Berg G, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy and blood: implications for suppressor macrophages in deciduas. American Journal of Reproductive Immunology 2003;50:444-452

Madazli R, Aydin S, Uludag S, Vildan O, Tolun N. Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 2003;82:792-802

Mathiesen L, Ekerfelt C, Berg G, Ernerudh J. Increased numbers of circulating interferon-gamma and interleukin 4 secreting cells during normal pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 1998;39:362-367

Mecacci F, Pieralli A, Bianchi B, Paidas MJ. The impact of autoimmune disorders and adverse pregnancy outcome. *Seminars in Perinatology* 2007 Aug;31(4):223-6.

Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. 1953 *Symposia of the Society for Experimental Biology* 14:320-338

Ministerio da Saúde (Anunciadas medidas para redução da mortalidade materna no país - 28/05/2003). Disponível em <[www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)> acesso dia 14.01.2008

Mitsui M, Yamashiro M, Yamamoto T. Anti-phosphatidylserine-prothrombin antibody in patients with recurrent abortion and preeclampsia. *Japanese Journal Clinical Immunology* 2005;28(1): 33-39

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T cell subsets-Th1, Th2 and more..  
Immunology Today 1996;17:138-46

Naccasha N, Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Berman S, Yoon, BH., Maymon E, Romero, R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2001;185(3): 1118-185

Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: A hypothesis and its implications. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1996;175(5):1365-1370

Odegård RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. British Journal of Obstetrics and Gynaecology 2000;107:1410-1416.

Ozkaya O, Sezik M, Sezik HT, Eyi EG. Leukocytosis might precede in-hospital eclampsia in preeclamptic women who do not receive magnesium sulfate. Journal of Perinatal Medicine 2006;34(5):378-82

Pala P, Hussell T, Openshaw P.J. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. Journal of Immunological Methods 2000;243:107-124

Peres LA, Oliveira MP, Cardoso MP, Spuza F, Woitexen AP, Bortolaz RT, Mariottini MI, Orlandi GP, Rymysz T, Katarinhuk BS, Matsuo T. Influência do tabagismo no desenvolvimento de pré-eclâmpsia. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2007;29(4):240-244

Petersen CM, Christenses EI, Andersen BS, Moller BK. Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells. *Experimental Cell Research* 1992;201:160

Poli de Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE, Antonello ICF, Barros E, Paula LG. Hipertensão na gestação. In: Nestor Schor. *Nefrologia Clínica*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Artes Médicas, 2007. Cap 40. (in press)

Prussin C, Metcalfe D. Detection of intracytoplasmatic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *Journal of Immunological Methods* 1995;188:117-128

Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997;18:478-82

Redmann CWG. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 2000;21:597-602

Redman CWG, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Seminars in Nephrology* 2004; 24(6):565-570

Redman CWG, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308: 1592-1594

Redman CWG, Sargent IL. Circulating microparticles in normal pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 2007; Nov, 1-5

Redman CWG, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999;180:499-506

Rein D, Göhring U, Kurbacher C, Pinto I, Breidenbach M, Mallmann P, Kolhagen H, Engel H. Cytokine expression in peripheral blood lymphocytes indicates a switch to T helper cells in patients with preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology* 2002;54:133-142

Robillard PY, Hulsey TC, Alexander GR, Keenan A, de Caunes F, Papiernick E. Paternity patterns and risk of preeclampsia in the last pregnancy in multiparae. *Journal of Reproductive Immunology* 1993;24:1-12

Sacks G, Redman C. An innate view of human pregnancy. *Immunology Today* 1999;20(3):114-118

Sacks GP, Redman CW, Sargent IL. Monocytes are primed to produce Th1 type cytokine IL-12 in normal pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology* 2003;131:550-555

Sacks G, Sargent IL, Redman CWG. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1998;179:80-86

Sacks GP, Seyani, L, Lavery S, Trew G. Maternal C-reactive protein levels are raised at 4 weeks gestation. *Human Reproduction* 2004;19(4):1025-1030

Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *Journal of Reproductive Immunology* 2000;47: 87-103

Saito S, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1 and Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clinical and Experimental Immunology* 1999;117:550-555

Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. Increased Th1-type immunity and decreased Th2-type immunity in patients with preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology* 1999;41:297-306



Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of immune system in preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine* 2007; Apr28(2):192-209

Sakai M, Shiozaki A, Sasaki Y, Yoneda S, Saito S. The ratio of interleukin (IL)-18 to IL-12 by peripheral blood mononuclear cells is increased in normal pregnant subjects and decreased in pre-eclamptic patients. *Journal of Reproductive Immunology* 2004;61: 133-144

Santiago MA, De Luca P, Bertho AL, Coutinho RB, Coutinho SG. Detection of Intracytoplasmatic Cytokines by Flow Cytometry *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2000;95(3): 401-402

Sharmonki JM, Salmon JE, Hyjek E, Baergen RN. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2007;196:167e.1-167e.5

Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CWG. NK cells and human pregnancy- an inflammatory view. *Trends in Immunology* 2006; Sep27(9):399-404

Sehmsdorf US, Zenclussen AC, Hertwig K, Joachim RA, Klapp BF, Hildebrandt MO. Human miscarriage is associated with increased number of CD26+ decidual lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* 2004;59:400-407

Sewell WA, North ME, Webster DB, Farrant J. Determination of intracellular cytokines by flow cytometer following whole-blood culture. *Journal of Immunological Methods* 1997;207:67-74

Shi Y, Ling B, Zhou Y, Gao T, Feng D, Xiao M, Feng L. Interferon-g expression in natural killer cells and natural killer T cells is suppressed in early pregnancy. *Cellular & Molecular Immunology* 2007;5(4):389-393

Sibai B, Dekker G, Kupfermine M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365(9461):785-99

Spector, N. Manual para a redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.150, 2002.

Tchórzewski H, Krasomski G, Biesiada L, Gowacka E, Banasik M, Lewkowicz P. IL-12, IL-6 and IFN $\gamma$  production by lymphocytes of pregnant women with rheumatoid arthritis remission during pregnancy. *Mediators of Inflammation* 2000; 9: 289-293

Terrone DA, Rinehart BK, May WL, Moore A, Magann EF, Martin Jr JN. Leukocytosis is proportional to HELLP syndrome severity: evidence for an inflammatory form of preeclampsia. *Southern Medical Journal* 2000;93:768-71 (abstract)

VanWijik M, Boer K, Van der Post J, Van Bavel, Sturk A. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia. Possible involvement in vascular dysfunction? American Journal of Obstetrics and Gynecology 2002;187(2):450-6

Watanabe M, Iwatani Y, Hidaka Y, Mitsuda N, Amino N. Changes in soluble CD4 and CD8 proteins in healthy pregnant and postpartum women. American Journal of Reproductive Immunology 1996; 36(4):220-227

Wegmann T, Guilbert L, Mosmann T. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunology Today 1993;14:353-356

Wilczynski JR. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia - the same basic mechanisms? Humann Immunology 2006;67:492-511

Wilczynski J, Glowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, Szpakowski M, Zeman K, Wilczynski J. Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and pre-eclampsia. Mediators of Inflammation 2002;11:105-111

Willheim M, Ebner C, Baier K. Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 1997;100:348-55

Wimalasundera RC, LARBalestier N, Smith JH, Ruiter A, Thom SA, Hughes AD, Poulter N, Regan L, Taylor GP. Pre-eclampsia, antiretroviral therapy, and immune reconstitution. *Lancet* 2002;360:1152-54

Womack J, Tien P, Feldman J, Shin J, Fennie K, Anastos K, Cohen M, Bacon M, Minkoff H. Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism* 2007;56:998-1004

Zadehmodarres S, Razzaghi M, Habibi G, Najmi Z, Jam H, Mosaffa N, Kaboosi M. Random urine proteine to creatinine ratio as a diagnostic method of significant proteinuria in pré-eclampsia. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2006;46:501-504

## ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

CICI/CRM

\*EQUIPE PARTICIPANTE: Adriani Galão, Antonella Conte, Bartira Costa, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Daniele Escouto, Domingos d'Avila, Florência Barreiro, Giovana Maffazioli, Giovani Gadonski, Iara Fagundes, Ioná Conceição, Ivan Antonello, João Schambeck, João Steibel, Mateus Alexandretti, Mariana Ambros, Marta Hentschke, Fabio Asquidamini, Alexandre Agra, Douglas Freitas, Gustavo Bordin,

## ANEXO 2

PROTOCOLO DE COLETA PADRONIZADO– LINHA DE PESQUISA HIPERTENSÃO NA GESTAÇÃO



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

## ANEXO 3

ARTIGO SUBMETIDO AO JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY

Total Th1/Th2 cytokine profile from peripheral blood lymphocytes in normal pregnancy and pre-eclampsia syndrome.

Iara dos Santos Fagundes, MSc, PhD; Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, MD, PhD; Denise Cantarelli Machado, MSc, PhD; Silvana Lunardini Alves, Bartira Ercilia Pinheiro da Costa, MSc, PhD.

Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Nefrologia), Faculdade de Medicina/Instituto de Pesquisas Biomédicas/Hospital São Lucas Pontíficia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av Ipiranga 6690, CEP 90610.000, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: No reprints requested

Name: Bartira Ercília Pinheiro da Costa

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

2° Andar Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas

Porto Alegre, RS, Brazil

ZIP cod: 90610-000

Phone: ++ 55 51 3367700

Fax: ++ 55 51 33367700

E-mail: bart@pucrs.br

Total Th1/Th2 cytokine profile from peripheral blood lymphocytes in normal pregnancy and pre-eclampsia syndrome.

Abstract:

Pre-eclampsia syndrome (PES) is a hypertensive disorder of the second half of pregnancy. The clinical signs are part of a severe systemic inflammatory response that includes leukocyte activation. Th1/Th2 cytokine imbalance towards a dominant Th1 profile has been described as a marker of the systemic inflammatory response in PES. The present study investigated the changes of total Th1/Th2 cytokines in CD3+ cells and peripheral blood lymphocytes distribution in women with pre-eclampsia comparing to normotensive pregnancies. Fifty-one pregnant women were included (PES=26, Controls=25). Total leukocytes and lymphocytes counts, percentages of CD3+ cells (immunocompetent T-lymphocytes), INF- $\gamma$ /CD3+ cells (Th1 lymphocytes), IL-4+/CD3+ and IL-10+/CD3+ cells (Th2 lymphocytes), CD4+/CD8+ cells (T helper/T cytotoxic lymphocytes) and CD26+ (dipeptidil-peptidase IV activity) cells were determined in blood samples by means of 2 color by flow cytometry analysis. A higher CD4+ lymphocyte subset levels in SPE comparing to normal pregnancy group ( $43.6\pm 5.8$  vs  $37.6\pm 5.6\%$ ;  $P<0.001$ ) was detected. All the others immunological parameters were not different between groups ( $P>0.05$ ). Activated immune status due higher Th cells levels is associated with systemic inflammatory response described in PES women. Th1/Th2 shift in PES was not detected in CD3+ cells, and may be present in other specific cell types such as in CD4+ and CD3- lymphocytes.

Key words: pregnancy, high-risk; inflammation; cytokine; CD4-Positive T-Lymphocytes, flow cytometry, interleukins.

## 1. Introduction

Pre-eclampsia is a pregnancy specific disorder occurring in 5% to 10% of all pregnancies and represents a leading cause of maternal and fetal morbidity. According to World Health Organization (WHO), in Latin America 25.7% maternal deaths are due to the hypertensive disorders of pregnancy (Khan et al, 2006). The maternal syndrome is clinically determined by hypertension (>140 mm Hg systolic or >90 mmHg diastolic) and proteinuria after the 20th gestational week (Gifford et al, 2000). Nulliparity, preexisting hypertension, increased maternal weight and previous pre-eclampsia are risk factors for the development of pre-eclampsia (Odegard et al, 2000); previous abortions and long periods of semen exposure from the same partner decrease the risk of pre-eclampsia (Robbilard et al, 1994).

Several hypotheses have been suggested trying to explain pre-eclampsia. Abnormal cytotrophoblast invasion of spiral arterioles, reduced uteroplacental perfusion, placental ischemia and endothelium dysfunction have been proposed (Granger et al, 2001). Fifty year ago, reproductive immunologists adopted the term “fetal allograft” to describe pregnancy immunological status (Medawar, 1953). The involvement of the maternal immune system in PES has also been proposed. According to Redman & Sargent (2003), inflammatory products from hypoxic pre-eclamptic placentas released in the maternal circulation are associated with an excessive inflammatory response involving both innate and adaptative immune reactions. This hypothesis is supported by features such leukocytes and coagulation activation, and an inflammatory cytokine profile (Borzychowski et al, 2006). The most interesting is that normal pregnancy already evokes activation of innate immune response (Sacks & Redman, 1999; Naccasha et al, 2001; Redman & Sargent, 2004).

Cytokines responses are generally classified as Th1, in which cells synthesize interleukin IL-2, interferon IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor TNF- $\alpha$  and induce cellular immunity, or Th2 response, associated with synthesis of IL-4, IL-5 and IL-10, and induction

of antibody production (Mosmann & Sad, 1996). It has been proposed that successful pregnancy represents a maternal tolerant state due to an immune bias toward Th2 immunity (Wegman et al, 1993). On the other hand, immune imbalance in Th1/Th2 ratio with Th1 cytokine profile dominance may contribute to the development of the pre-eclampsia syndrome (Saito et al, 1999; Dong & Wang, 2005; Darmochwal-Kolaraz et al,1999).

Since recent reports have shown that pregnancy complications can also be associated with decreased Th1/Th2 balance (Zenclussen et al, 2002; Chaouat et al, 2002) or even Th1 and Th2 type cytokine overproduction (Hayakawa et al, 2000), the aim of this study was to revised this controversial issue in pre-eclampsia at a single cell level using flow cytometry for intracytoplasmatic cytokine measurements. We also examined for quantitative changes in peripheral blood leukocytes and CD3+ (immunocompetent T-lymphocytes), CD4+ (T-helper cells) and CD8+ (T-cytotoxic cells) distribution in order to evaluate immunological and hematological parameters that could distinguish pre-eclampsia syndrome from normal pregnancy. Finally, we quantify and compare between the groups the number of immune cells with dypeptidil-peptidase IV activity (CD26+) used as marker of Th1 activity (Willheim et al, 1997).

## 2. Patients and Methods

### 2.1 - Subjects

A transversal study including patients assisted at the Obstetrics Department of Hospital São Lucas, PUCRS, Brazil, from September 2006 until October 2007 was conducted. For the purpose of the analysis, the patients were classified in Normal Pregnancy (NP: n=25) and Pre-Eclampsia Syndrome (PES: n=26). Normal pregnancy was defined as normotensive women, with negative dipstick test for urinary protein and pregnancy not complicated by fetal growth retardation or other maternal obstetric problems. Pre-eclampsia

syndrome was diagnosed in pregnant with hypertension ( $\geq 140$  mmHg or  $\geq 90$  mm Hg) and proteinuria ( $\geq 300$  mg/24h) developed after the 20th gestational week. Urinary protein excretion was estimated either in a 24-hour urine collection, or as urine protein/creatinine ratio in a random sample. None had history of diabetes or autoimmune disease.

Blood pressure measurements were performed in the seated position, after a 20-minute rest, with the patient's arm at the level of the heart using a mercury sphygmomanometer and an appropriate cuff size adjusted to the arm circumference.

The University and Hospital Scientific and Ethics Committees approved this study. All patients signed informed consent.

## 2.2 - Flow cytometry analysis

### 2.2.1 - Intracytoplasmatic cytokines

Percentages of Th1 and Th2 cells and Th1/Th2 ratio were determined by flow cytometry. Approximately 10 ml of maternal blood was obtained in vacutainer tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. PBMC were suspended at  $2 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 medium (LGC Biotec, BR-30011.0), placed in flat-bottomed 24-well plates (TPP: 92024), and were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin in the presence of Golgi blocker monensin. After 5 hours of incubation at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  (Sanyo  $\text{CO}_2$  incubator), the PBMC were resuspended in RPMI-1640, fixed and incubate for 10 minutes with a solution contained paraformaldehyde and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). After fixation, the cells were incubated for 20 minutes at dark with surface marker CD3 coupled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD-Pharmingen <sup>TM</sup> catalog number 555332). Permeabilizing solution was added, and the cells were washed and resuspended. The cells were stained for 20 minutes

at dark with phycoerythrin (PE)-labelled anti-human monoclonal antibodies specific for cytokines: anti-INF-g PE (IQProducts, code IQP-160R), anti IL-10 PE (IQProducts, code IQP-165R) and anti IL-4 PE (IQProducts, code IQP 162R) according to the suppliers instructions (Cytodetect kit<sup>TM</sup>, IQProducts, code 366). Fluorochrome-conjugated, isotype matched IgG1 and IgG2 for PE and FITC fluorocromes (Simultest<sup>TM</sup> Control  $\gamma_1/\gamma_{2a}$ -BD-Pharmingen, catalog number: 340041) were used as controls to detect non-specific binding. Data from 20,000 cells were acquired in the list mode in flow cytometer (FACSCalibur) and analyzed with software WinMdi 2.8. Lymphocytes were distinguished by forward and side scatter characteristics and gated on these physical characteristics (Figure 1a). Gated lymphocytes were analyzed for surface markers and intracellular cytokines (Figure 1 b, c and d). Double positively labeled populations were determined by quadrant gate which were set to include  $\leq 1\%$  of the negative control (Figure 1e).

### 2.2.2 - Lymphocytes subsets

One or two-color immunofluorescence staining was performed in whole blood with the use of following antibodies: anti-CD3 (BD-Pharmingen<sup>TM</sup> catalog number 555332, Figure 2b), anti-CD4/CD8 (against helper/inducer and supressor/cytotoxic lymphocytes) (FK-Biotecnologia, catalog number FP306, Figure 2c), anti-CD26 (BD-Pharmingen<sup>TM</sup> catalog number, 340423, Figure 2d). Whole blood aliquots were incubated and labeled with FITC and/or PE fluorescences. Cell suspensions were lysate (FACS Lysing Solution- BD Pharmingen<sup>TM</sup>, catalog number: 349200) and washed. Data from 20.000 events were acquired on FACSCalibur cytometer (Becton-Dickinson, San Jose,USA) in list mode and analyzed with WinMdi 2.8 software. For background control IgG1 FITC and IgG2a PE were used (Figure 2e).



### 2.3 - Statistical analysis

Continuous data were presented as mean and standard deviation and compared between groups using Student's t test. Asymmetric data were described using median and minimum and maximum values and compared using Mann-Whitney U test. Categorical data were summarized with count and percentages with statistical significance assessed via chi-square test or Fisher's exact test. Significance level was set to  $\alpha=0,05$ . Data were analyzed using SPSS version 12.

### 3. Results

Patients were similar regarding age, gestational age at sample collection, laboratorial parameters and maternal obstetric history as shown in Table 1.

Considering the lymphocytes subsets distribution, the lymphocytosis in PES group was due the Th CD4+ cells ( $P<0.001$ ). The higher frequency of CD4+ cells in PES group also elevates the CD4/CD8 ratio ( $P=0.04$ ). Within the mononuclear populations, the percentage of Th1 and Th2 cells did not differ between the groups ( $P>0.05$ ).

### 4. Discussion

The present study showed that the percentage of CD4+ cells is increased in pre-eclampsia syndrome in comparison to normal pregnancy, and no difference in the expression of total Th1 and Th2 cytokines or Th1/Th2 ratio using flow cytometry analysis.

In 1993, Tom Wegmann created the "immunothropic hypothesis" which postulated that cytokines secreted by maternal TCD4<sup>+</sup> lymphocytes is strongly shifted toward Th2 profile (IL-4, IL-6, IL-10) during pregnancy, while Th1 activity (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) would be incompatible with a successful pregnancy (Raghupaty, 1997). This hypothesis is supported

by the clinical observation that pregnancy in humans is accompanied by exacerbation of lupus erythematosus (Th2 disease) and remission of rheumatoid arthritis (Th1 dependent disease) (Del Prete et al, 1994).

Pre-eclampsia syndrome is a serious disease of the second half of human pregnancy characterized by systemic maternal disturbances and classical clinical signs hypertension and proteinuria. Some investigators have described pre-eclampsia as an enhanced systemic inflammatory condition in comparison to normal pregnancy (Redman & Sargent, 2003; Sacks et al, 1998; Redman & Sargent, 2004; Dekker & Sibai, 1998; Redman et al, 1999) and Th1 dominant cytokine profile has been pointed as a reaction of the adaptative immune system in pre-eclampsia (Saito et al, 1999; Dong et al, 2005; Darmochwal-Kolaraz et al, 1999; Arriaga-Pizano et al, 2005). Considering that Th1 and Th2 cytokines are not only produced by CD4<sup>+</sup> T helper cells, but also by CD8<sup>+</sup> Tc (Cerwenka et al, 1998) and NK T cells (Shi et al, 2007) both CD3<sup>+</sup> cells, we evaluate if total Th1/Th2 cytokine ratio in blood lymphocytes could be equally higher in pre-eclampsia. Also, we look for differences in the number of effectors blood lymphocytes subtypes in normal pregnancy and in pre-eclampsia.

No differences in Th1/Th2 cytokines expression was observed between normal and pre-eclamptic pregnancies in the present study, even employing flow cytometry, a technique that evaluates the contribution of cytokine expression in a particular cell type. This surprising result was inconsistent with previous reports on Th1/Th2 immunity in pre-eclampsia. Such apparent conflicting results could be related to differences caused by different technical conditions used to quantify cytokines, such as ELISA employed for plasmatic or supernatant from PBMC cytokine detection (Holmes et al, 2003) and immunohistochemistry (Hennessy et al, 1999). Taking in account the lymphocytes subset able to demonstrate Th1 and Th2 profile, the flow cytometry studies for prevalent Th1 immunity detection in pre-eclampsia usually considers CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>lymphocytes. There are few studies evaluating others sources of

cytokine expression within CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Tc cells) T cells and all CD3<sup>+</sup> lymphocytes in this disease. Recently, Shi et al (2007) did not observe differences in percentages of INF $\gamma$  and IL-4 expression in CD3<sup>+</sup> lymphocytes comparing to non-pregnant and early-pregnant women. Darmochwal-Kolaraz et al (2002) did not find differences in INF $\gamma$  expression in T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> lymphocytes from women with pre-eclampsia comparing to normal pregnant, but a strong NK cell contribution for secretion of this cytokine especially by lymphocytes from pre-eclampsia group. Borzychowski et al (2005) did not observed changes in Tc1/Tc2 and in Th1/Th2 cell ratios comparing lymphocytes from non-pregnant, normal pregnant and pre-eclampsia women. However, the same investigators observed a higher “in vitro” INF $\gamma$  expression in non stimulated NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) and NKT cells (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) from pre-eclamptic women which suggest that dominant Th1 cytokine profile in pre-eclampsia might be predominantly by cells belonging to the innate system (NK cells), instead of the adaptative system (T helper cells, specially). Additionally, a higher percentage of NK and NKT was present in peripheral blood of early pregnant women compared to non-pregnant women suggesting the probably immunomodulator effect in pregnancy (Shi et al, 2007). NK cells are important INF $\gamma$  producers and were not evaluated in this study, perhaps explaining the lack of differences regarding Th1 immunity between the groups. Even enhanced INF $\gamma$  expression described in NKT cells (CD3<sup>+</sup>56<sup>+</sup>) from pre-eclamptic patients (Borzychowski et al, 2005) was not evident in the CD3<sup>+</sup> fraction evaluated in this series, perhaps due its low frequency in peripheral blood.

Up regulation of dypeptidil-peptidase IV activity (CD26<sup>+</sup>) have been demonstrated to define a Th1 phenotype among T lymphocytes with enhanced INF $\gamma$  production (Willheim et al, 1997). No differences in percentage of CD26<sup>+</sup> mononuclear cells were observed between groups, in agreement with the similar Th1/Th2 cytokines profile. According to our results, total Th1/Th2 cytokine profile and CD26<sup>+</sup> expression in mononuclear cells are not related

with systemic inflammatory response described in pre-eclampsia. Sehmsdorf et al (2004) associated the higher percentage of decidual CD26<sup>+</sup> and Th1 lymphocytes from women with spontaneous miscarriages, a condition related with similar immunological aspects to pre-eclampsia. However, the same association was not evident in peripheral blood, even considering CD3<sup>+</sup>/CD26<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD26<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>/CD26<sup>+</sup> subsets. Taken together, it is possible that CD26 and Th1 cytokine expression in placental lymphocytes could be related to local, and not systemic inflammation in pre-eclampsia. Further studies may confirm this hypothesis.

Despite similar total Th1/Th2 cytokines pattern demonstrate in our patients, CD4<sup>+</sup> blood cells were increased in pre-eclampsia. This is in agreement with Dimitrakova-Dzhambazova et al (2005) suggesting the CD4<sup>+</sup> association in exacerbated systemic inflammatory response observed in pre-eclampsia. As our study evaluate cytokine expression in total lymphocyte population, it is possible that CD4<sup>+</sup> subset may show a different cytokine pattern.

In conclusion, total Th1/Th2 cytokines profiles do not allow to differentiate the immunological status between pre-eclampsia and normal pregnancies. The analysis of the specific cell types for cytokine expression seems to be a more elucidative tool to evaluate of Th1 and Th2 cells participation in the immunology of pre-eclampsia. The elevated percentage of blood CD4<sup>+</sup> cells in pregnancies complicated by pre-eclampsia support exacerbated systemic inflammatory response in pre-eclampsia. Analysis of CD3<sup>+</sup> lymphocytes, such as NK and dendritic cells and considering others cytokines with central regulatory effects (IL-12 and IL-18), also should be considered during inflammation of pre-eclampsia and normal pregnancy.

## 5. Acknowledgements

The present study received grant support from MS/CNPq/FAPERGS 008/2004. The Nephrology and Cellular Biology Laboratories have received support from Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). We thank Dr. Mário Bernardes Wagner for the statistical analysis, Dra. Nanci Nardi and Dr. Jorge Neumann for their support.

## 6 - References

Khan, K.S., Wojdyla, D., Say, L., Gülmezoglu, A., Look, P.F.A., 2006. WHO analysis of causes of maternal death: a systemic review. *Lancet*. 36,1066-1074.

Gifford, R.W., August, P.A., Cunningham, G., Green, L.A., Lindeheimer, M.D., McNellis, D., 2000. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, S1-S22.

Odegard, R., Vatten, L., Nilsen, S., Salvesen, K., Austgulen, R., 2000. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *B.J.O.G.* 107,1410-1416

Robbilar, P.Y., Hulsey, T.C., Périanin, J., Janky, E., Miri, E.H., Papierik, E., 1994. Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet*. 344, 973-975

Granger, J.P., Alexander, B., Bennett, W., Khalil, R., 2001. Pathophysiology of Pregnancy-Induced Hypertension. *Am. J. Hypertens.* 14,178S-185S.

Medawar, P.B., 1953. Some immunological and endocrinological problem raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7,30-38

Redman, C.W., Sargent, I.L., 2003. Pre-eclampsia, the placenta and maternal inflammatory response- a review. *Placenta*. 17, S21-S27

Borzychowski, A.M., Sargent, C.W.G., Redman, C.W.G., 2006. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 11,309-316

Sacks, G., Redman, C., 1999. An innate view of human pregnancy. *Immunol. Today*. 20(3),114-118

Naccasha, N., Gervasi, M.T., Chaiworapongsa, T., Berman, S., Yoon, B.H., Maymon, E., Romero, R., 2001. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185(3),1118-1185

Redman, C.W.G., Sargent, I.L., 2004. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Sem. Nephrol.* 24(6),565-70

Mosmann, T.R., Sad, S., 1996. The expanding universe of T cell subsets-Th1, Th2 and more. *Immunol. Today*. 17,138-146

Wegman, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R., 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol. Today*. 14,353-356

Saito, S., Sakai, Y., Tanabe, H., Tsuda, H., Michimata, T., 1999. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin. Exp. Immunol.* 117,550-555

Dong, M., Wang, J., 2005. Serum T helper 1 and 2 type cytokines in preeclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 89, 288-290

Darmochwal-Kolaraz, D., Gorzelak-Leszczynska, B., Rolinski, J., Oleszczuk, J., 1999. T helper-1 and T helper-2 type cytokine imbalance in pregnant women with preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 86,165-170

Zenclussen, A.C., Fest, S., Busse, P., Joachim, R., Klapp, B.F., Arck, P.C., 2002. Questioning the Th1:Th2 paradigm in reproduction: peripheral levels of IL-12 are down regulated in miscarriage patients. *Am. J. Reprod. Immunol.* 48,245-251

Chaouat, G., Zourbas, S., Ostojic, S., Delage-Lappree, G., Dubanchet, S., Ledee, N., Martal, J., 2002. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-fetal interface which might challenge the classical Th1:Th2 dichotomy. *J. Reprod. Immunol.* 53,241-256

Hayakawa, S., Fujikawa, T., Flukuoka, H., Chisima, F., Suzuki-Karakasi, M., Ohkoshi, E., Ohi, H., Fujii, T., Tochigi, M., Satoh, K., Shimizu, T., Nishinarita, S., Nemoto, N., Sakuari, I., 2000. Murine fetal resorption and experimental pre-eclampsia are induced by both excessive Th1 and Th2 activation. *J. Reprod. Immunol.* 47,121-138

Willheim, M., Ebner, C., Baier, K., 1997. Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(h1) subsets. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 100,348-355

Raghupathy, R., 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today.* 18(10),478-482

Del Prete, G., Maggi, E., Romagnani, S., 1994. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation and role in disease. *Labor. Invest.* 70,299-306

Sacks, G.P., Studena, K., Sargent, K., Redman, C.W.G., 1998. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179,80-86

Dekker, G.A., Sibai, B.M., 1998. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179,1359-1375

Redman, C.W.G., Sacks, G.P., Sargent, I.L., 1999. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180,499-506

Arriaga-Pizano, L., Jimenez-Zamudio, L., Vadillo-Ortega, F., Martinez-Flores, A., Herrerias-Canedo, T., Hernandez-Guerrero, C., 2005. The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the choriodecidual and fetal compartments. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 12(5),335-342

Cerwenka, A., Carter, L.L., Reome, J.B., Swain, S.L., Dutton, R.W., 1998. In vivo persistence of CD8 polarized T cell subsets producing Type 1 or Type 2 cytokines. *J. Immunol.* 161,97-105

Shi, Y., Ling, B., Zhou, Y., Gao, T., Feng, D., Xiao, M., Feng, L., 2007. Interferon-g expression in natural killer cells and natural killer T cells is suppressed in early pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.* 5(4),389-393

Holmes, V.A., Wallace, J.M.W., Gilmore, W.S., McFaul, P., Alexander, H.D., 2003. Plasma levels of the immunomodulatory cytokine interleukin-10 during normal human pregnancy: a longitudinal study. *Cytokine.* 21,265-269

Hennessy, A., Pilmore, H.L., Simmons, L.A., Painter, D.M., 1999. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J. Immunol.* 163,2491-3495

Darmochwal-Kolaraz, D., Rolinski, J., Leszcynska-Gorzelaek, B., Oleszcuk, J., 2002. The expression of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *Am. J. Reprod. Immunol.* 48,381-386



Borzychowski, A.M., Croy, B.A., Chan, W.L., Redman, C.W.G., Sargent, I., 2005. Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 35,3054-3063

Sehmsdorf, U.S., Zenclussen, A.C., Hertwig, K., Joachim, R.A., Klapp, B.F., Hildebrandt, M.O., 2004. Human miscarriage is associated with increased number of CD26+ decidual lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 59,400-407

Dimitrakova-Dzhambazova, E., Milchev, N., Pavlov, P., Dimitrakov, D., 2005. Lymphocyte populations and subpopulations in peripheral blood of pregnant women with pre-eclampsia. *Akush. Ginekol. (Sofia)*. 44(1),40-4

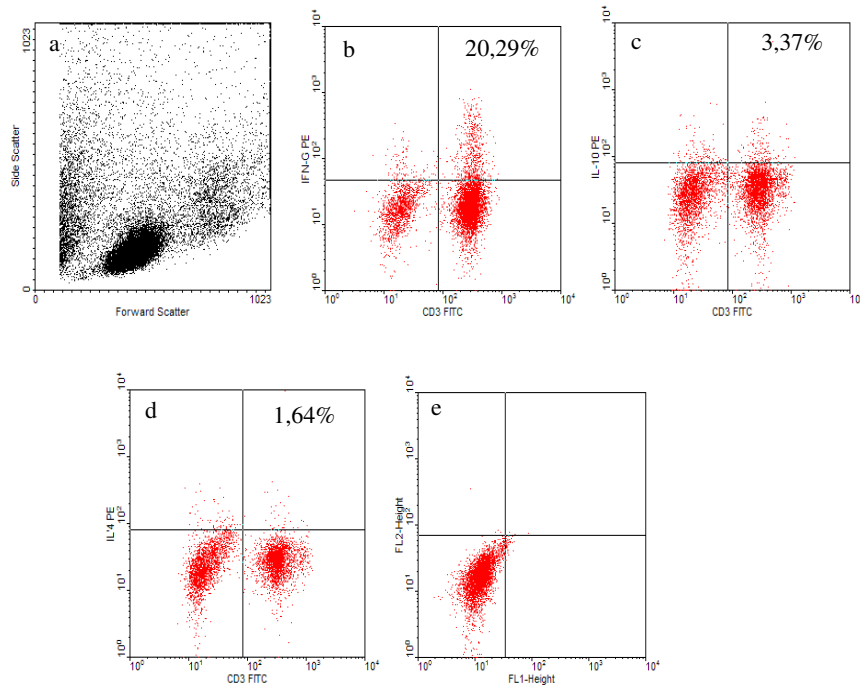


Figure 1: FACS analysis of peripheral blood lymphocytes were double stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD3 and phycoerythrin (PE)-conjugated interleukin monoclonal antibodies (IFN- $\gamma$ , figure 1b; IL-10, figure 1c; and IL-4 figure 1d). A gate was set on the lymphocytes region by characteristics forward and side scatter parameters (figure 1a) and FITC and PE fluorochrome data were analyzed. Isotypic control conjugated IgG1 and IgG2a were used as control (figure 1e).

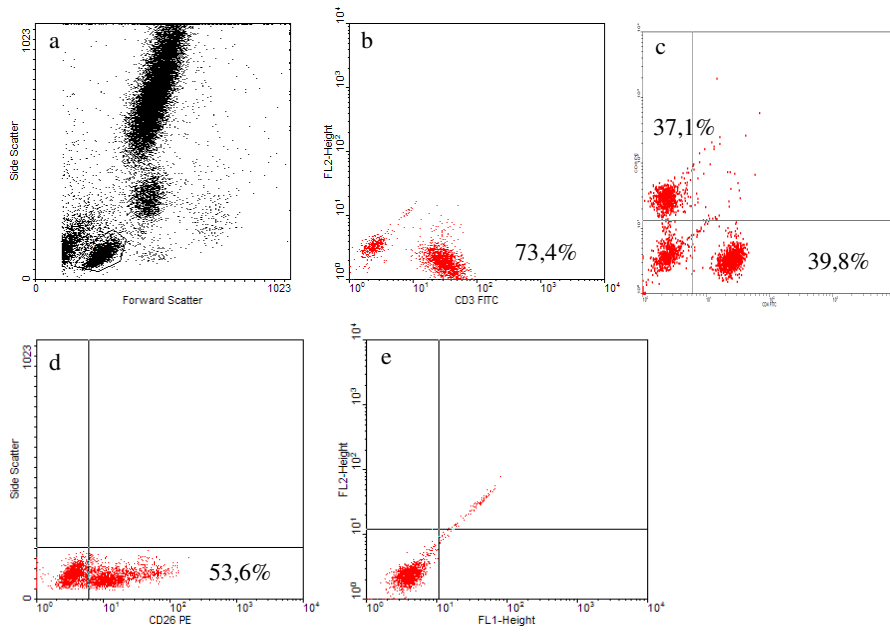


Figure 2: FACS analysis of CD3, CD4/CD8 and CD26 labeled cells. Peripheral blood lymphocytes stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD3 (figure 2b) and CD4 (figure 2c, low right) monoclonal antibodies and phycoerythrin (PE)-conjugated CD8 (figure 2c, upper left) and CD26 (figure 2d) monoclonal antibodies. A gate was set on the lymphocyte by characteristics forward and side scatter parameters (figure 2a) and FITC and PE fluorochrome data were analyzed. Isotypic control conjugated IgG1 and IgG2a were used as control (figure 2e).

Table 1: Demographical and laboratorial characteristics of normal pregnancy and pre-eclampsia syndrome groups.

		Normal pregnancy (n=25)	Pre-eclampsia syndrome (n=26)	p
Maternal age (y)		25.6±6.8	26.1±6.5	0.749 <sup>a</sup>
Blood pressure measure (mmHg)	Systolic	116.3±10.8	149.9±16.2	<0.001 <sup>a</sup>
	Diastolic	74.2±10.2	96.5±17.6	<0.001 <sup>a</sup>
Height (cm)		160.8±6.6	160.6±6.5	0.895 <sup>a</sup>
Weight (kg)		70.6±9.2	84.9±20.3	0.002 <sup>a</sup>
BMI (kg/height <sup>2</sup> )		27.7±3.0	32.9±7.8	0.003 <sup>a</sup>
P/C ratio		nd	0.4 (0.3-4.1)	
Proteinuria (mg/24 horas)		nd	404 (139-4420)	
Creatinine (mg/dl)		nd	0.8±0.1	
Uric acid (mg/dl)		nd	5.0±1.4	
Maternal Obstetric History n (min to max)	Gravity	2 (1 to 8)	2 (1 to 7)	0.383 <sup>b</sup>
	Abortion	0 (0 to 3)	0 (0 to 3)	0.504 <sup>b</sup>
	Parity	0 (0 to 4)	1 (0 to 5)	0.356 <sup>b</sup>
Gestational age at sample collect (wk)		32.5±7.1	33.8±3.8	0.444 <sup>a</sup>
Gestational age at term (wk)		39.4±1.5	35.4±4.0	<0.001 <sup>a</sup>
Perinatal data	Caesarian n (%)	7 (28)	20 (77)	0.023 <sup>b</sup>
	Fetal weight (g)	3519±472	2646±906	<0.001 <sup>a</sup>
	Placental weight (g)	682±158	619±212	0.336 <sup>a</sup>

Data were presented as mean $\pm$ SD or median (minimum to maximum) or counts (percentages). <sup>a</sup>: Student t test; <sup>b</sup>: Mann-Whitney U test; nd= not determinate.

Table 2: White cell counts, lymphocytes distribution and intracytoplasmatic cytokine expression in studied groups.

	Normal pregnancy (n=25)	Pre-eclampsia syndrome (n=26)	p	
Whole white cell counts ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	10.2 $\pm$ 2.4	10.5 $\pm$ 2.4	0.758 <sup>a</sup>	
	Granulocytes	7.7 $\pm$ 2.4	7.7 $\pm$ 1.9	0.916 <sup>a</sup>
	Lymphocytes	1.8 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.5	0.174 <sup>a</sup>
	Monocytes	0.6 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	0.104 <sup>a</sup>
CD3+ (%)	75.1 $\pm$ 7.9	74.3 $\pm$ 10.4	0.765 <sup>a</sup>	
CD4+ (%)	37.7 $\pm$ 5.6	43.6 $\pm$ 5.8	0.002 <sup>a</sup>	
CD8+ (%)	26.9 $\pm$ 7.3	23.7 $\pm$ 5.8	0.148 <sup>a</sup>	
CD4/CD8	1.5 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.5	0.017 <sup>a</sup>	
CD26+ (%)	52.5 $\pm$ 8.7	49.5 $\pm$ 6.9	0.336 <sup>a</sup>	
IFN $\gamma$ /CD3+ (%)	13.5 (3.6-31.3)	11.7 (6.9-29.4)	0.855 <sup>b</sup>	
IL-4/CD3+ (%)	1.9 (1.1-2.9)	1.9 (0.7-4.2)	0.687 <sup>b</sup>	
IL-10/CD3+ (%)	2.8 (1.5-4.4)	3.1 (1.2-7.3)	0.259 <sup>b</sup>	
IFN $\gamma$ /IL-4 (%)	11.1 (2.8-18.9)	5.4 (1.6-31.0)	0.400 <sup>b</sup>	
IFN $\gamma$ /IL-10 (%)	4.3 (1.7-13.8)	3.3 (0.9-23.9)	0.569 <sup>b</sup>	

Data were presented as mean $\pm$ SD. <sup>a</sup>: Student t test; <sup>b</sup>: Mann-Whitney U test.