

Elevados níveis séricos de citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e IL-17A em recém-nascidos de mulheres com pré-eclâmpsia na gestação

Increased serum levels of cytokines IL-6, IL-8, IL-10 and IL-17A in newborns of women with preeclampsia during pregnancy

Sâmara Araújo de Moraes¹; Igor Paiva²; Marcela Albuquerque²; Marina Cadena²; Thomás Vírgilio Gomes²; Juliana Schetinni, PhD²; Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte³, Leuridan Cavalcante Torres, PhD².

¹ Aluna do curso de graduação de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC) do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (IMIP/CNPq), Recife, Brasil.

² Laboratório de Pesquisa Translacional Anthony Hart, IMIP, Recife, Brasil.

³ Doutora em Saúde Materno Infantil pelo Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Docente da Pós-graduação stricto sensu do IMIP; Coordenadora da UTI Pediátrica do Hospital Esperança

***Autor correspondente:**

Leuridan Cavalcante Torres, PhD

Instituto de Medicina Integra Prof. Fernando Figueira (IMIP),

Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Rua dos Coelhos, 300. Boa Vista

CEP 50070-550

Telefone: 81 98659 6766

E-mail: leuridan.torres@gmail.com

RESUMO

OBJETIVO: avaliar as citocinas pró-inflamatórias de RNs de gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia. **MÉTODOS:** foi realizado um estudo exploratório translacional com 15 gestantes com pré-eclâmpsia admitidas no pré-parto do Centro Obstétrico (IMIP) e as amostras de sangue de cordão umbilical neonatal foram processadas no Laboratório de Pesquisa Translacional (IMIP). A casuística compreendeu 15 RNs e 15 controles (crianças saudáveis menores de 3 anos e idade). Foi coletado sangue do cordão umbilical dos RNs e sangue periférico dos controles, em tubos com anticoagulante EDTA e dosadas as citocinas pró-inflamatórias utilizando o kit BD™ CBA – *Human inflammatory* (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) por citometria de fluxo. A concentração de IL-17A foi determinada por ELISA. Os dados foram analisados pelo *GraphPad Prims*® 6. Utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-whitney para análise entre os grupos. **RESULTADOS:** os RNs apresentaram níveis séricos elevados de citocinas IL-8 (p< 0,0001), IL-10 (p=0,0006), IL-17A (p=0,0003) e IL-6 (p= 0,002) quando comparados aos controles saudáveis. **CONCLUSÃO:** os RNs têm maturação do sistema imune desde intraútero demonstrada pela capacidade de produção de citocinas após insulto inflamatório e hipertensivo da pré-eclâmpsia na gestação.

Palavras-Chave: pré-eclâmpsia – recém-nascidos – citocinas – inflamação

ABSTRACT

OBJECTIVE: to evaluate pro-inflammatory cytokine of newborns of pregnant women who had preeclampsia during pregnancy. **METHODS:** we performed a translational exploratory study with 15 pregnant women with preeclampsia admitted in the Obstetric Center (IMIP) and blood samples of neonatal umbilical cord were processed in the Translational Research Laboratory (IMIP). Samples comprised 15 RNs and 15 controls (healthy children under 3 years old). Umbilical cord blood was collected from peripheral blood of newborns and controls, in EDTA anticoagulant tubes, and assayed proinflammatory cytokines using BD TM CBA Kit - Human inflammatory (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 IL-12 and TNF- α) by flow cytometry. Concentration of IL-17A was determined by ELISA. Data were analyzed by GraphPad Prims® 6. Nonparametric Mann-Whitney test was used for analysis between groups. **RESULTS:** newborns had elevated serum levels of cytokine IL-8 (p <0.0001), IL-10 (p = 0.0006), IL-17A (p = 0.0003) and IL-6 (p = 0.002) when compared to healthy child controls. **CONCLUSION:** RN immune system undergoes prior intrauterine maturation demonstrated by the ability to produce inflammatory cytokines against an inflammatory and hypertensive insults in preeclampsia during pregnancy.

Keywords: preeclampsia, newborns, cytokines, inflammation.

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia é uma síndrome hipertensiva inflamatória sistêmica, principal causa de morte obstétrica direta no mundo e uma das causas importantes de mortalidade perinatal¹⁻³. Caracteriza-se pela associação de hipertensão e proteinúria durante a gravidez, em geral, após a 20ª semana de gestação^{4, 5}. O aumento da pressão arterial acomete todo o sistema vascular corporal com efeitos deletérios em órgãos-alvo, principalmente o ocular, hepático, pulmonar, renal e cerebral materno, além do comprometimento fetal⁶.

A etiopatogenia da pré-eclâmpsia não está bem esclarecida. Sabe-se que existe a deficiência na segunda onda de migração trofoblástica nas artérias espiraladas maternas, que resulta em aumento da resistência vascular placentária, menor perfusão sanguínea feto-materno, o que leva a lesões no endotélio vascular que liberam marcadores inflamatórios, como as citocinas⁷⁻⁹. Tem sido descritos ainda, alterações no perfil lipídico¹⁰, ativação leucocitária¹¹, aumento do stress oxidativo¹² e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mulheres com pré-eclâmpsia. Gestações complicadas pela pré-eclâmpsia, apresentam risco elevado de natimorto, restrição de crescimento fetal intrauterino e parto prematuro¹³.

Entretanto, muitos estudos têm sido realizados nas gestantes com pré-eclâmpsia, todavia, as repercussões no sistema imune dos recém-nascidos nascidos (RNs) em gestações complicadas pela pré-eclâmpsia ainda tem lacunas na literatura. Por sua vez, os RNs apresentam populações celulares bem definidas e funcionalmente ativas, com capacidade de liberar citocinas frente a estímulos antigênicos infecciosos ou não infecciosos. Alguns autores também relataram o aumento de linfócitos T em RNs com produção de interferon gama (IFN- γ) e interleucina 8 (IL-8)¹⁴. A IL-8 é uma citocina encontrada em elevados níveis no início da vida, cuja função é promover a ativação de

neutrófilos e ampliar o processo inflamatório inicial, sendo uma das primeiras linhas de defesa do organismo¹⁵.

Devido à escassez na literatura de trabalhos que avaliam a produção de citocinas em RNs de mães com pré-eclâmpsia, a prevalência elevada de pré-eclâmpsia nas gestantes no Brasil¹⁶, portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as citocinas pró-inflamatórias no cordão umbilical de RNs cujas mães apresentaram pré-eclâmpsia durante a gestação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Tipo de Estudo

Foi realizado um estudo exploratório, analítico e translacional.

2.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado no pré-parto do Centro Obstétrico e Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) no período de Agosto de 2014 a Junho de 2015.

2.3 Casuística

Recém-Nascidos (RNs): a casuística compreendeu um total de 15 RNs de mulheres com diagnóstico clínico de pré-eclâmpsia durante a gestação.

Controles saudáveis: foram incluídos 15 crianças saudáveis com idade de 01 mês a 3 anos, sem sinais clínicos de infecção ou de internamento nos últimos 30 dias, hospitalizadas no IMIP para realização de cirurgia eletiva de pequena complexidade como hérnia umbilical, fimose, entre outros.

2.4 Amostragem

Esse estudo compreendeu 15 RNs, nascidos entre 33 a 40 semanas gestacionais, de parto cesariano, sendo 10 do sexo feminino e 5 masculino, e em sua maioria com peso maior que 2000g.

2.5 Critérios elegibilidade

Critérios de Inclusão: gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia internadas no IMIP, sem antecedentes de hipertensão. Os critérios utilizados para o diagnóstico clínico de pré-eclâmpsia foram a detecção de pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria $\geq 0.3g$ ou $\geq +/3$ de proteinúria nas gestantes.

Critérios de exclusão: gestantes com doenças autoimunes, gestação múltipla, as com impossibilidade de avaliar sua participação na pesquisa (em coma, distúrbios psiquiátricos, entre outros), imunodeficiências, com positividade sorológica para o vírus da imunodeficiência humana 1 e 2 (HIV 1 e 2), sífilis e/ou com sintomas clínicos de infecção.

2.6 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do IMIP sob o No. **CAAE:** 29385614.1.0000.5201. Todas as mulheres assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo com a Resolução 466/2012.

2.7 Amostra biológica

Toda coleta de amostra biológica foi realizada em tudo contendo anticogulante tipo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (BD Vacutainer®). Foram coletados 12 mL de sangue de cordão umbilical clampeado após expulsão fetal no parto e 4 mL de sangue periférico de controles saudáveis. Todos os tubos foram processados para separação do plasma.

2.8 Determinação da concentração de citocinas inflamatórias

A concentração das citocinas foi determinada no plasma de RNs, utilizando o kit BD™ CBA – *Human inflammatory* (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α), segundo as instruções do fabricante. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo BD Facsverse® (BD Biosciences, CA). As análises foram realizadas no programa FCAP Array (BD Biosciences, CA) e os valores expressos em pg/mL.

A concentração da citocina IL-17A foi determinada por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), utilizando o *Human IL-17 DuoSet ELISA* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conforme instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada no leitor de placa HumaReader HS (Human, Wiesbaden, Germany). A curva foi calculada através do programa *Graphpad Prism*® 6 (Graphpad Software Inc., EUA) e as concentrações expressas em pg/mL.

2.9 Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa *GraphPad Prism*® 6 (GraphPad Software, Califórnia, USA). Para a análise estatística entre os grupos de controles saudáveis e RNs, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-whitney sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

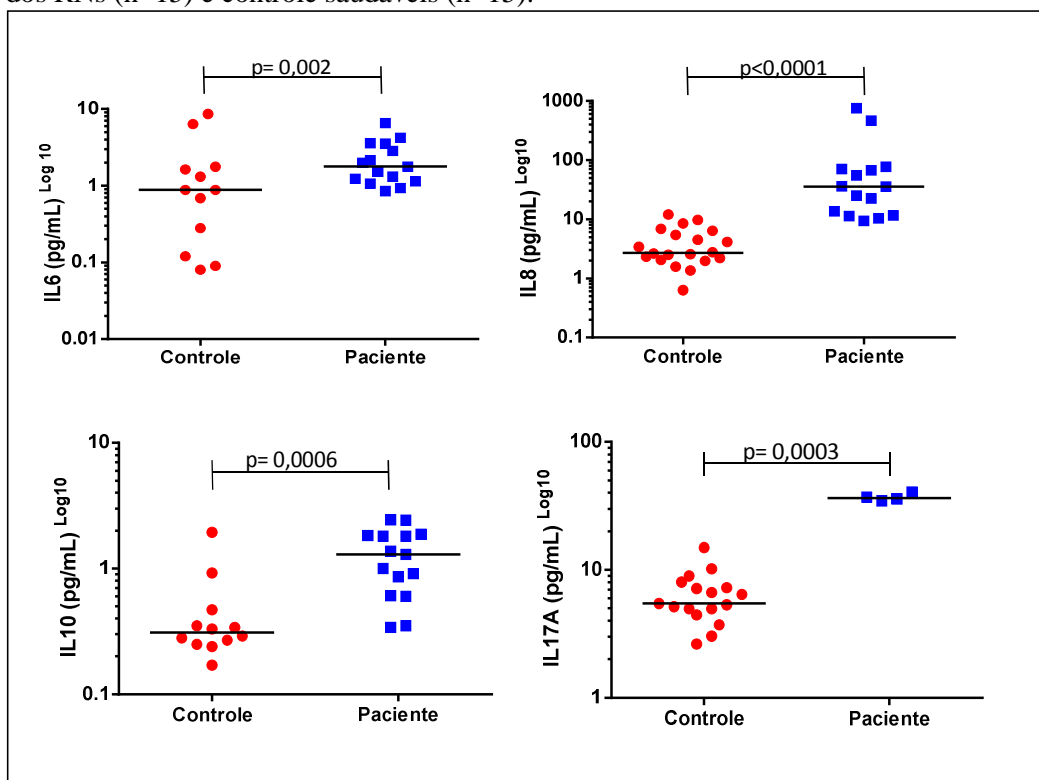
Verificou-se que os RNs apresentam níveis séricos elevados de citocinas IL-8 ($p < 0,0001$), IL-10 ($p=0,0006$), IL-17A ($p=0,0003$) e IL-6 ($p= 0,0020$) quando comparados aos controles saudáveis. Não houve diferença estatística quanto aos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-12p70 entre os grupos (**Figura 1**). Os valores de mediana e dos percentis (25-75) das citocinas estão apresentados na **Tabela 1**. Não houve detecção de níveis de IL-1 β nas crianças saudáveis.

Tabela 1. Concentração sérica de citocinas inflamatórias (pg/mL) dos recém-nascidos e crianças saudáveis

Citocinas pg/mL	Controles (n=15) Mediana (IQR*)	RNs (n=15) Mediana (IQR*)	P
IL-1β	NI**	4,05 (1,9-6,3)	#
IL-6	0,8 (0,1-1,4)	1,8 (1,1-3,5)	0,002
IL-8	2,7 (2,1-6,1)	35,4 (11,6-70,3)	< 0,0001
IL-10	0,3 (0,2-0,4)	1,3 (0,6-1,8)	0,0006
IL-12p70	1,5 (0,3-3,8)	1,05 (0,4-2,1)	0,6407
TNF-α	0,8 (0,37-1,2)	0,75 (0,4-1,5)	0,6745
IL-17A	5,5 (4,7-7,6)	36,5 (35-38,8)	0,0003

*IQR – intervalo interquartil (25 – 75) **NI – níveis indetectáveis # Não foi possível análise estatística. Foram considerados significativos, valores de P < 0.05. Análise estatística entre os grupos (Mann Withney U test).

Figura 1. Análises das concentrações séricas (pg/mL) de citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e IL-17A dos RNs (n=15) e controle saudáveis (n=15).



*Foram considerados significativos, valores de P < 0.05. Análise estatística entre os grupos (Mann Withney U test).

**As citocinas TNF- α e IL-12p70 não foram representadas na figura, pois não houve diferença estatística entre os grupos

4. DISCUSSÃO

A pré-eclâmpsia é um processo inflamatório sistêmico mediado por citocinas inflamatórias, porém, a maioria dos estudos em sangue periférico materno, sendo escassos os em sangue de RNs coletados a partir do cordão umbilical¹⁷⁻¹⁹. O sistema imune do RN passa por uma transição do ambiente estéril para o meio externo rico em antígenos, já foi evidenciado que suas células são íntegras e funcionais quando estimulada *in vitro*. Alguns autores demonstraram que RNs pré-termos tardios apresentam ferramentas adequadas para ativar a resposta imune contra antígenos estranhos²⁰, dependendo do estímulo do meio^{20,21}.

As células T efetoras são classificadas de acordo com o perfil de citocinas produzidas. As células Th1 produzem IFN- γ e interleucina (IL)-2 e atuam na resposta imune celular^{22,23}. Por sua vez as células Th2, produzem e secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e estão envolvidas na resposta imune humoral e nos processos alérgicos por meio da síntese de anticorpos IgE²²⁻²⁴, como também na imunoregulação, sendo as células Th17 produtoras de IL-17A e IL-6 e presentes nas doenças autoimunes^{22,24}.

Os RNs de mulheres com pré-eclâmpsia na gestação apresentaram elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e as do tipo Th17, enquanto RNs de mulheres com gestações saudáveis apresentam uma resposta efetora do tipo Th2. Isso sugere que a pré-eclâmpsia pode estimular uma resposta inflamatória exacerbada nos RNs.

Nesse sentido, foi relatado que RNs pré-termos apresentam elevados níveis de IL-6 e TNF- α e está relacionada à susceptibilidade a displasia broncopulmonar crônica²⁵. Como também na sepse neonatal, foi relatado elevados níveis de IL-6, TNF- α , e IL-1 β ²⁶.

Alem disso, sabe-se que o aumento de níveis de IL-8 e IL-17A promovem o recrutamento e ativação de neutrófilos para os tecidos, com elevadas chances de danos

teciduais. A IL-8 é uma quimiocina atraente de neutrófilos, ela já tem sido relatada na literatura como uma das primeiras citocinas liberadas por RNs, tendo como função a defesa contra patógenos, quando os mesmos são expostos ao ambiente¹⁵. Verificou-se aumento significativo dessa citocina nos RNs de mulheres com pré-eclâmpsia na gestação e pode estar relacionada a resposta inflamatória persistente, contribuindo para disfunção endotelial²⁷. Alguns autores relataram que o nível elevado de IL-8 nos RNs está relacionado com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e no tempo de meia-vida dos neutrófilos, o que leva a um processo inflamatório prolongado, com liberação de enzimas que degradam a matriz endotelial, sendo um importante fator nos RNs de mulheres com pré-eclâmpsia²⁸⁻³⁰.

Em contrapartida, o presente estudo evidenciou elevados níveis de citocinas imunoreguladoras IL-10⁸, o que sugere um mecanismo de compensação do sistema imune do RN na tentativa de diminuir a resposta inflamatória causada durante a gestação.

5. Conclusão

Concluí-se que os RNs apresentam maturidade do sistema imune intraútero demonstrada pela capacidade de produção de citocinas inflamatórias em situações adversas como a pré-eclâmpsia durante a gestação. Para uma melhor análise será necessário aumentar o tamanho amostral de RNs e separar os grupos de pré-termo e termo. É importante ressaltar que as alterações encontradas nos níveis de mediadores inflamatórios podem estar relacionadas com o aumento das chances de óbito fetal na gestante com pré-eclâmpsia.

5. REFERÊNCIAS

- 1- World Health Organization. The world health report: make every mother and child count. Geneva: World Health Organization; 2005.
- 2- Confidential Enquiry into Maternal and Child Health (CEMACH). Perinatal Mortality 2006: England, Wales and Northern Ireland. London, United Kingdom: CEMACH; 2008.
- 3- Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin perinatol* 2009;33:130–7
- 4- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL: Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999, 180:499-506.
- 5- Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y: The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med* 2007, 28:192-209.
- 6- Agatista PK, Ness RB, Roberts JM, Costantino JP, Kuller LH, McLaughlin MK. Impairment of endothelial function in women with a history of preeclampsia: an indicator of cardiovascular risk. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(4):H1389-93.
- 7- Redman CW, Sargent IL: Immunology of pre-eclampsia. *Am Reprod Immunol* 2010; 63:534-543
- 8- Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001;86(6):2505–2512.
- 9- Mehendale S, Kilari A, Dangat K, Taralekar V, Mahadik S, Joshi S. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2008;100(3):234–238.
- 10- Catarino C, Rebelo I, Belo L, et al. Fetal lipoprotein changes in pre-eclampsia. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2008;87(6):628–634.
- 11- Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, et al. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2009;61(5):346–359.
- 12- Bernardi F, Guolo F, Bortolin T, Petronilho F, Dal-Pizzol F. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2008;34(6):948–951.
- 13- Basso O, Rasmussen S, Weinberg CR, Wilcox AJ, Irgens LM, Skjaerven R. Trends in fetal and infant survival following preeclampsia. *JAMA*. 2006; 296:1357–1362.
- 14- Gibbons D, Haque SFY, Silberzahn T, Hamilton K, Langford C, Ellis P, Carr R, Hayday AC: Neonates harbour highly active $\gamma\delta$ T cells with selective impairments in preterm infants. *Eur. J. Immunol*. 2009. 39: 1794–1806

- 15- Gibbons D, Fleming P, Virasami A, Michel M, Sebire N J, Costeloe K et al: Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nature Medicine* 2014.
- 16- Oliveira SMJV, Domingues CA. Prevalência da eclâmpsia em parturientes. *Rev Ginecol Obstet* 2004; 15: 148-54.
- 17- Toldi G, Rigó J Jr, Stenczer B, Vásárhelyi B, Molvarec A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. *Am Reprod Immunol* 2011; 66:223-229
- 18- Saito S: Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. *Immunol Cell Biol* 2010; 88:615-617.
- 19- Solhberg E, Saghafian-Hedengren S, Bachmayer N, Hamad RR, Bremme K, Holmlund U. Pre-eclampsia affects cord blood Nk cell expression of activation receptors and serum cytokine levels but not CB monocyte characteristics. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71:178-188.
- 20- Quinello C, Silveira-Lessa AL, Ceccon MEJR, Cianciarullo MA, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P: Phenotypic Differences in Leucocyte Populations among Healthy Preterm and Full-Term Newborns. *Scand J Immunol*. 2014, 1: 57-70
- 21- Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol*. 2012; 40: 186-204.
- 22- Polese B. Pregnancy hormones and CD4⁺ T cells blood levels during human pregnancy. *Front Endocrinol*. 2014; 5: 106.
- 23- Doherty TA, Broide DH. Group 2 innate lymphoid cells: new players in human allergic diseases. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015; 25(1): 1-11.
- 24- Fettke F, Schumacher A, Costa SD. B cells: the old new players in reproductive immunology. *Front Immunol*. 2014; 23; 5: 285.
- 25- Huusko JM, Karjalainen MK, Mahlman M, Haataja R, Kari MA, Andersson S: A study of genes encoding cytokines (IL6, IL10, TNF), cytokine receptors (IL6 R, IL6ST), and glucocorticoid receptor (NR3C1) and susceptibility to bronchopulmonary dysplasia. *BMC Med Genet* 2014.
- 26- Y. Tasci, B. Dilbaz, B. Onal U et al: The value of cord blood interleukin-6 levels for predicting chorioamnionitis, funisitis and neonatal infection in term premature rupture of membranes. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 2006, vol. 128, no. 1-2, pp. 34–39.
- 27- Mellembakken J R, Aukrust P, Hestdal K, Ueland T, Åbyholm T, Videm V: Chemokines and Leukocyte Activation in the Fetal Circulation During Preeclampsia. *Hypertension*. 2001;38:394-398
- 28- Tosum M, Celik H, Avci B, Yavuz E, Aiper T, Malatyalioglu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in normal pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23:880-886.

- 29- Mellembakken JR, Aukrust P, Hestdal K, Ucland T, Abyholm T, Videm V. Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia. *Hypertension* 2001; 38:394-398.
- 30- Wang WJ, Hao CF, Lin Y, Yin GJ, Bao SH, Quiu LH, Lin QD. Increased prevalence of T helper 17 (TH17) cells in peripheral blood and deciduas in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Am Reprod Immunol* 2010; 84:164-170.