ALINE PAIXÃO ALENCAR

**PERFIL INFLAMATÓRIO EM GESTAÇÕES COM DISTÚRBIOS
HIPERGLICÊMICOS: ENFOQUE NA ANÁLISE DAS VILOSIDADES
CORIÔNICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

ALINE PAIXÃO ALENCAR

**PERFIL INFLAMATÓRIO EM GESTAÇÕES COM DISTÚRBIOS
HIPERGLICÊMICOS: ENFOQUE NA ANÁLISE DAS VILOSIDADES
CORIÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Biologia Celular e Tecidual

Orientadora:
Profa. Dra. Estela Bevilacqua

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Alencar, Aline Paixão.

Perfil inflamatório em gestações com distúrbios hiperglicêmicos: enfoque na análise das vilosidades coriônicas / Aline Paixão Alencar. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevlacqua.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Fatores de regulação atuando nos processos de implantação embrionária e na interface materno-fetal.

Versão do título para o inglês: Inflammatory profile in pregnancies with hyperglycemic disorders: focus on analysis of chorionic villi.

1. Placenta humana 2. Hiperglicemia 3. Inflamação 4. Inflamassoma 5. NF-kB 6. Células de Hofbauer I. Bevlacqua, Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0122/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Paixão Alencar.

Título da Dissertação: Perfil inflamatório em gestações com distúrbios hiperglicêmicos: enfoque na análise das vilosidades coriônicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevlacqua.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

1164

São Paulo, 05 de julho de 2013.

PARECER 1125/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, APROVOU o projeto intitulado: "Ativação da via do Inflamassoma por receptores do tipo Toll presentes nas células de Hofbauer das placentas de mães com Síndrome Metabólica e diferentes níveis de Hiperglicemia" da pesquisadora ESTELA BEVILACQUA e a aluna ALINE PAIXÃO ALENCAR.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 05.07.2014.

Atenciosamente,

Profa. Dra. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho

**A Deus, minha fortaleza, que tem me dado forças e me
acompanhado desde o início de minha jornada;**

**A minha família, por entender os motivos de minha
ausência, e sempre estar ao meu lado, independente
das adversidades.**

Vocês são tudo pra mim!

À Professora Doutora Estela Bevilacqua

**Uma mulher forte, íntegra e profissional, que nunca
me desamparou, mesmo nos momentos mais difíceis.**

**Muito obrigada por acreditar em meu potencial, e
permitir a realização de um grande sonho... serei
sempre grata a ti!**

AGRADECIMENTOS

Durante minha longa jornada, me deparei com pedras imensas em meu caminho. Felizmente, Deus sempre me enviou anjos para me auxiliar na remoção das mesmas. Agradeço a todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, seja com palavras de afeto, com “aquele” abraço inesperado, ou com vibrações positivas para que tudo desse certo.

Aos meus pais, Oscar e Simone, pessoas fantásticas das quais não encontro palavras para descrever a importância. Muito obrigada pelos grandes exemplos, pelos conselhos e pelo amor, que foram cruciais para me manter em pé;

Aos meus irmãos, brilhos da minha alma, meus orgulhos; a minha irmã Gabi, pela cumplicidade que sempre tivemos e por todas as situações que passamos, sempre juntas; aos meus irmãos Tavinho e Juninho, pelo amor e pelo incentivo. Ao meu irmão de coração e espírito, Víctor, por tudo que representa em minha vida; sempre disposto a me ajudar, a me ouvir, a me fazer sorrir...

Aos meus primos e tios, em especial a tia Claudia, que me auxiliou quando eu tanto precisava;

Aos meus avós, Anita e Francisco, que tanto amo e admiro, pelas orações e pela fé que sempre tiveram em sua neta;

Ao meu grande amor, Biomédico e “gênio do mal” (rsrsrs) Marcus Henrique, por ser meu companheiro, meu cúmplice de todas as horas; por me fazer sentir parte de sua família maravilhosa; por conseguir despertar o melhor de mim, me fazer sentir as melhores sensações, e dar as melhores gargalhadas, claro!

Aos meus grandes amigos Bia, Geovane, Sol e Ju, por nunca me abandonarem, pelos momentos de doideira e pela grande amizade que já se estende há anos;

À Rose Farias e Karen Prado (a grande mãe e a noivinha linda!), duas pessoas maravilhosas que eu tive a sorte de conhecer, e que agora são minhas grandes amigas. Muito obrigada por enxugarem minhas lágrimas nas horas difíceis, pelos conselhos valiosos que eu levarei por toda a vida, pelo companheirismo e pelo carinho. Amo vocês!

Agradeço grandemente à minha co-orientadora e Pós Doutora Simone Corrêa, que esteve comigo durante toda minha jornada; pelos conselhos, as horas de sono perdidas, e pela dedicação e o amor que você colocou neste projeto. Obrigada por me confiar como a primeira idealizadora deste trabalho, que eu tenho certeza de que está só no início!

Agradeço especialmente aos pós-doutorandos pela participação crucial na conclusão desta dissertação: A Dra Aline Lorenzon, ao Dr Alexandre Borbely, a Dra

Sara Gomes e a Dra Elaine Cardoso, e à querida Dra Carla Bandeira, pela paciência e dedicação em transmitir seus conhecimentos, sempre dispostos a ajudar;

A todos os amigos do eterno Trofos'Lab, muito obrigada por estes quatro anos de união. Aqui aprendi a conviver com as diferenças, ter paciência e a ouvir o próximo; cresci, amadureci e aprendi não só a realizar experimentos de bancada, mas também a ter senso crítico, e raciocinar como cientista; à Mara e Fernanda, pelos conselhos, pela torcida e amizade;

Aos queridos estagiários, Paola, Ying, Rafaela, Alex, Fernanda, Gustavo, entre muitos outros que pelo laboratório passaram;

À Dra Rossana Pulcinelli e a Dra Cilene Rebouças, participantes de minha banca de qualificação, pelas grandes sugestões que contribuíram para a excelência do trabalho;

Ao Professor Sergio Ferreira por me disponibilizar seu precioso tempo sempre que eu necessitei; pelo incentivo, pelos ensinamentos sobre imunohistoquímica e Biologia Tecidual e por todo carinho;

Aos colaboradores da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial à Dra Marilza Rudge, Dra Iracema Calderon, Dra Debora Damasceno e Dra Lessandra de Rosa, pelo suporte científico e a disponibilização de materiais. Muito obrigada!

Um agradecimento especial à Dra Jusciele Moreli, pelo valioso auxílio nos dados clínicos do trabalho, pelos conselhos e pela dedicação e carinho.

Ao Professor Cristóforo do Departamento de Farmacologia do ICB e a Larissa pela realização dos experimentos de atividade de NF- κ B;

À secretária do departamento Regina, pelo suporte nos momentos burocráticos mais difíceis;

Aos funcionários da biblioteca, principalmente à Tereza e Renata, por me ajudar neste momento decisivo;

A CAPES, pelo apoio financeiro ao projeto;

Às gestantes que tiveram sua importante colaboração para a realização deste grande sonho.

*“(...) Ele me invocará, e eu lhe
responderei; estarei com ele na
angústia; dela o retirarei e o
glorificarei (...)”*

Salmo 91, versículo 15

RESUMO

ALENCAR, A. P. **Perfil inflamatório em gestações com distúrbios hiperglicêmicos: Enfoque na análise das vilosidades coriônicas.** 2015. Dissertação 98 f. (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A hiperglicemia favorece o desenvolvimento de um quadro de inflamação subclínica que pode modificar diversos mecanismos celulares, entre eles a resposta imunológica do indivíduo. Em diferentes modelos, o aumento dos níveis séricos de glicose ativa Receptores Semelhantes a Toll (TLR) 2 e 4, ativando o fator de transcrição nuclear B (NF- κ B) e induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas (ILs) IL-1 β , IL-18 e IL-33. Esse evento está relacionado à ativação de um complexo denominado inflamassoma. O inflamassoma é um complexo multiproteico intracelular que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (Caspases), tendo grande importância para a regulação da imunidade em condições fisiológicas e no reconhecimento de sinais de perigo. O inflamassoma NLRP1 foi descrito em doenças autoimunes, como DM1, enquanto o NLRP3 foi descrito em patologias metabólicas, como o DMG, o DM2 e a obesidade. A ligação de NLRP com o fator adaptador ASC (proteína semelhante à partícula associada à apoptose contendo domínio CARD) ativa a caspase-1 que cliva a pró-IL-1 β e a pró-IL-18 em suas formas maduras. A placenta tem papel crucial estabelecendo a interface entre mãe e feto. Em sua porção vilosa, em contato com o sangue materno, é formada por um eixo mesenquimal revestido por sincício- e citotrofoblasto, contendo em seu interior inúmeros macrófagos ou células de Hofbauer, potencialmente capazes de resposta de defesa. Este estudo teve como objetivo: i) investigar o perfil inflamatório placentário e sérico de gestantes com distúrbios glicêmicos, através da dosagem de IL-6, IL-1 β , MCP-1 e iNOS (soro e placenta) e da imunolocalização de MCP-1 e iNOS; ii) investigar a possível participação da via do inflamassoma nos vilos coriônicos dessas gestantes, imunolocalizando os receptores superficiais TLR2 e TLR4, avaliando a translocação de NF- κ B para as regiões nucleares, analisando a expressão proteica de NLRP1, NLRP3, ASC e CASPASE-1 em homogenatos placentários; iii) analisar o efeito de diferentes concentrações de glicose na expressão proteica de NLRP1, NLRP3 e ASC em explantes de vilos coriônicos de placenta de gestantes saudáveis. Nossos resultados mostraram aumento de IL-6, IL-1 β e MCP-1 no soro de gestantes portadoras de hiperglicemia (Hiperglicemia Gestacional Leve, *Diabetes Mellitus* Gestacional e *Diabetes Mellitus* 2), sugerindo uma inflamação sistêmica, possivelmente relacionada aos maiores níveis glicêmicos encontrados nesta gestantes. Estas moléculas inflamatórias também estavam aumentadas nos vilos coriônicos das gestantes hiperglicêmicas; iNOS e MCP-1 foram imunolocalizados em células do estroma viloso, que inclui numerosos macrófagos fetais (CD68+). Células estromais também foram reativas para TLR2 e TLR4. A translocação de NF- κ B foi maior nas placentas de gestantes hiperglicêmicas, assim como a expressão proteica de NLRP1, NLRP3, ASC e caspase 1 clivada. Nossos resultados sugerem que independente do distúrbio hiperglicêmico, os vilos placentários respondem a hiperglicemia materna com o aumento da expressão de receptores e moléculas da via dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3, o que sugere sua participação na produção de citocinas inflamatórias pela placenta fetal.

Palavras-chave - Placenta humana. Hiperglicemia. Inflamação. Inflamassoma.

ABSTRACT

ALENCAR, A. P. **Inflammatory profile in pregnancies with hyperglycemic disorders: Focus on analysis of chorionic villi.** 2015. 98 p. Masters thesis (Tissue and Cellular Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Hyperglycemia favors the development of subclinical inflammation that may change various cellular mechanisms, including the immune responses. In different models, the increase in serum glucose levels can activate Toll Like Receptors (TLR) 2 and 4, by activating the nuclear transcription factor B (NF- κ B) and inducing the secretion of proinflammatory cytokines, such as the interleukins IL-1 β , IL-18 and IL-33. This is related to the activation of a complex called inflammasome. The intracellular inflammasome is a multiprotein complex that acts on the activation of enzymes of the cysteine aspartic-proteases family (Caspases), close related to the immunity regulation in physiological conditions and in recognition of danger signals. The NLRP1 inflammasome was first described in autoimmune diseases like DM1, while the NLRP3 was described in metabolic diseases, such as gestational diabetes (DMG), type 2 diabetes (DM2) and obesity. The binding between NLRP and the adapter factor ASC (protein similar to the particle associated to apoptosis containing the domain CARD) activates caspase-1, which cleaves pro-IL-1 β and pro-IL-18 in its mature forms. The placenta plays a crucial role in establishing the interface between mother and fetus. In the villous area, in contact with maternal blood, it is formed by a mesenchymal axis coated with syncytio- and cytotrophoblast and containing numerous cells including macrophages or Hofbauer cells (capable of innate immune response). This study aimed to: i) investigate the placental and serum inflammatory profile of pregnant women with glucose disorders, estimating IL-6, IL-1 β and MCP-1 (serum and placenta) levels and, the immunolocalization of MCP-1 and iNOS; ii) investigate the possible participation of inflammasome pathway in the chorionic villi through: - immunolocalization of the surface receptors TLR2 and TLR4; - assessing the translocation of NF- κ B into the nuclear region; - analyzing protein expression NLRP1, NLRP3, ASC and Caspase-1 in placental homogenates; iii) analyze the effect of different glucose concentrations on NLRP1, NLRP3 and ASC protein expression in explants of chorionic villi of healthy pregnant women. Our results showed increased IL-6, IL-1 β and MCP-1 in serum of hyperglycemic pregnant women (DM2; GDM and mild hyperglycemia, MHG) suggesting a systemic inflammation associated with glycemia. In chorionic villi of hyperglycemic pregnant women these inflammatory molecules were increased; iNOS and MCP-1 were immunolocalized in the villous stroma cells and, fetal macrophages (CD68+) were much more numerous. Stromal cells were also reactive to TLR2 and TLR4. The translocation of NF- κ B was higher in placentas of hyperglycemic pregnant women, as well as the protein expression NLRP1, NLRP3, ASC and cleaved caspase-1. Our results suggest that regardless the hyperglycemic disorder, placental villi respond to maternal hyperglycemia with increased expression of receptors and molecules of the NLRP1 and NLRP3 inflammasome pathway, suggesting involvement of these key signaling platforms in the production of inflammatory cytokines by the fetal placenta.

Keywords - Human Placenta. Hyperglycemia. Inflammation. Inflammasome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vilosidade coriônica e suas relações com o endométrio.....	22
Figura 2 - Esquema mostrando as características estruturais da placenta humana.....	23
Figura 3 - Esquema mostrando a estrutura das vilosidades coriônicas de uma placenta humana.....	24
Figura 4 - Esquema das principais vias de sinalização dos receptores do tipo <i>Toll</i>	39
Figura 5 - Organização estrutural dos inflamassomas NLRPs.....	40
Figura 6 - Expressão proteica de IL-1 β e IL-6 em soro e porção fetal das placentas de mães saudáveis e com distúrbios hiperglicêmicos.....	62
Figura 7 - Expressão gênica de iNOS e MCP-1 em vilos placentários.....	63
Figura 8 - Imunolocalização de iNOS, MCP-1 e CD68 na região vilosa de placentas de mães saudáveis e hiperglicêmicas.....	65
Figura 9 - Imunolocalização e quantificação da reação de TLR2, TLR4 e CD68 na porção fetal da placenta de gestantes saudáveis e hiperglicêmicas.....	66
Figura 10 - Atividade nuclear de NF- κ B na região fetal de placentas de mães saudáveis e hiperglicêmicas	67
Figura 11 - Análise densitométrica da expressão de NLRP1 e NLRP3 no compartimento fetal das placentas de gestantes saudáveis e hiperglicêmicas...	68
Figura 12 - Análise densitométrica da expressão de ASC e caspase-1 no compartimento fetal das placentas de gestantes saudáveis e hiperglicêmicas...	69
Figura 13 - Análise densitométrica de NLRP1, NLRP3 e ASC em explantes de vilos coriônicos de gestantes saudáveis cultivados com diferentes concentrações de glicose.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos grupos de estudo.....	48
Tabela 2 - Anticorpos e condições de incubação para reações imunohistoquímicas e ensaios de <i>Western Blotting</i>	57
Tabela 3 - Características clínicas da população de estudo.....	60

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVEATURAS E SIGLAS

APCs – Células apresentadoras de antígeno

ASC- Proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD

BSA – Albumina de soro bovino

CT – Citotrofoblasto

CTEV – Citotrofoblasto extraviloso

CARD- Domínio de recrutamento de caspase

CASPASE-1- Cisteína-aspartato protease-1

DTT – Dithiothreitol

DAMP- Padrão Molecular Associado a Danos

DM- *Diabetes Mellitus*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FMB- Faculdade de Medicina de Botucatu

HEPES – ácido (4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico

HGL- Hiperglicemia Gestacional Leve

IFN- γ – Interferon gama

IL– Interleucina

iNOS- Sintase de Óxido Nítrico induzida

kDa – kilodaltons

LPS – Lipopolisacarídeo

MCP-1- Proteína Químioatraente de Monócitos-1

NOD: Domínio de Oligomerização Nuclear

NLRP- Receptor semelhante ao receptor NOD contendo um domínio *pyrin*

Na₃VO₄ – Ortovanadato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NaF – Fluoreto de sódio

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B

NK – Células *Natural Killer*

NO- Óxido Nítrico

NLR- receptor semelhante ao receptor NOD

PBS – tampão salina e fosfato

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PAMP- Padrão Molecular Associado a Patógenos

PCR- Proteína-C reativa

PG- Perfil Glicêmico

RIPA – Ensaio de Radioimunoprecipitação

RT-PCR- Reação em Cadeia Polimerase- Transcriptase Reversa

SC – Sinciciotrofoblasto

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

TBS – Tampão Salina-Tris-Fosfato

TTG- Teste de Tolerância à Glicose

TGF- β – Fator transformador do Crescimento beta

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TLR- Receptor semelhante ao Receptor *Toll*

UNESP- Universidade Estadual Paulista

WB- *Western Blotting*

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Implantação embrionária e formação da placenta	20
1.2 A placenta – estrutura e funções	21
1.2.1 Vilosidades coriônicas	23
1.2.2 Componentes vilosos	25
1.2.2.1 Citotrofoblasto	25
1.2.2.2 Sinciciotrofoblasto	26
1.2.2.3 Células mesenquimais	27
1.3 Hiperglicemia na gestação	29
1.3.1 Diabetes Mellitus Tipo 1 e tipo 2 (DM1/DM2)	29
1.3.2 Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)	30
1.3.3 Hiperglicemia Gestacional Leve (HGL)	31
1.3.4 Alterações placentárias nos distúrbios hiperglicêmicos	32
1.4 Hiperglicemia e inflamação durante a gestação	33
1.5 Inflamassoma- componentes e ativação	35
1.5.1 Padrões Moleculares Associados a Patógenos (DAMPs) e Padrões Moleculares Associados ao Perigo (PAMPs)	35
1.5.2 Receptores Semelhantes ao Receptor Toll (TLR)	36
1.5.3 Inflamassoma	39
1.6 Inflamassoma e Hiperglicemia	40
1.7 Proposta de estudo	42
2 OBJETIVOS	44
2.1 Gerais	44
2.2 Específicos	44
2.2.1 Parte 1	44
2.2.2 Parte 2	44
3 METODOLOGIA	46
3.1 Equipamentos, reagentes e procedências	46
3.2 Aspectos éticos	47
3.3 Local de estudo e seleção das gestantes	47
3.4 Definição dos critérios de inclusão e exclusão	48

3.5 Caracterização Clínica da população de estudo	48
3.6 Coleta das amostras de placenta.....	49
3.7 Obtenção de homogenatos placentários	50
3.8 Parte 1 – Análise do Perfil Inflamatório nas vilosidades coriônicas nas gestações acometidas por distúrbios glicêmicos	50
3.8.1 <i>Dosagem de biomarcadores inflamatórios no ambiente materno e placentário fetal</i>	<i>50</i>
3.8.2 <i>Expressão de biomarcadores da inflamação nos vilos placentários</i>	<i>52</i>
3.8.2.1 <i>Expressão Gênica de MCP-1 e iNOS.....</i>	<i>52</i>
3.8.2.2 <i>Imunolocalização de MCP-1 e iNOS</i>	<i>53</i>
3.8.2.3 <i>Análise estatística</i>	<i>53</i>
3.9 Parte 2 – Participação da via do inflamassoma nos vilos coriônicos de gestantes acometidas por distúrbios glicêmicos	53
3.9.1 <i>Imunohistoquímica de TLR2/TLR4.....</i>	<i>54</i>
3.9.2 <i>Atividade nuclear de NF-kB.....</i>	<i>54</i>
3.9.3 <i>Expressão proteica dos fatores associados a via do inflamassoma.....</i>	<i>55</i>
3.9.4 <i>Cultivo de explantes de vilos coriônicos de placenta humana.....</i>	<i>57</i>
4 RESULTADOS.....	60
4.1 Análise das participantes dos diferentes grupos de estudo	60
4.2 Análise do perfil inflamatório nas gestações acometidas por distúrbios glicêmicos.....	61
4.2.1 <i>Dosagem de biomarcadores inflamatórios no ambiente materno e placentário fetal</i>	<i>61</i>
4.2.2 <i>Expressão dos biomarcadores da inflamação nos vilos placentários.....</i>	<i>63</i>
4.3 Participação da via do inflamassoma nos vilos coriônicos de gestantes acometidas por distúrbios glicêmicos	64
4.3.1 <i>Imunolocalização de TLR2/TLR4</i>	<i>64</i>
4.3.2 <i>Atividade nuclear de NF-kB.....</i>	<i>67</i>
4.3.3 <i>Expressão proteica de fatores associados a via do inflamassoma</i>	<i>67</i>
4.3.4 <i>Avaliação da influência da hiperglicemia sobre a presença das proteínas associadas ao inflamassoma</i>	<i>69</i>
5 DISCUSSÃO	70
5.1 Características gerais das gestantes	72
5.2 Houve relação entre hiperglicemia e aumento de moléculas pró-inflamatórias no soro materno e componentes fetais da placenta.....	72

5.3 A via do inflamassoma no compartimento fetal da placenta	75
<i>5.3.1 A reatividade a TLR2 e TLR4 está alterada no compartimento viloso das placentas de gestantes hiperglicêmicas.....</i>	<i>75</i>
<i>5.3.2 A atividade de NF-κB.....</i>	<i>75</i>
<i>5.3.3 O aumento de expressão de NLRP1/3, ASC e de Caspase 1 clivada sugere que inflamassomas são ativados nos quadros hiperglicêmicos</i>	<i>78</i>
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Implantação embrionária e formação da placenta

A implantação embrionária é o processo pela qual o embrião, na fase de blastocisto, adquire um posicionamento fixo e estável na parede endometrial. O embrião nessa fase é formado por uma camada única de células epitelióides, o trofoblasto, que reveste a cavidade blastocística e o embrioblasto, que dará origem ao corpo do embrião. Este processo se caracteriza pelas seguintes três fases: aposição, aproximação e posicionamento do blastocisto na cavidade uterina, adesão, forte aderência do trofotoderma ao epitélio luminal uterino e, invasão, intrusão do embrião no estroma endometrial e abertura dos capilares subepiteliais (BENIRSCHKE et al., 2006).

Durante a adesão do blastocisto ao epitélio uterino, as células trofoblásticas iniciam um processo de diferenciação formando o citotrofoblasto, com intensa atividade proliferativa e o sinciotrofoblasto, formado a partir da fusão de células oriundas do citotrofoblasto (BENIRSCHKE et al., 2006).

Com a progressão da gestação, inicia-se a formação da placenta. O sinciotrofoblasto torna-se bastante aumentado; este aumento é seguido pela proliferação das células do citotrofoblasto que, ao empurrar o sinciotrofoblasto formam estruturas digitiformes, denominadas de vilosidades. Os vilos formados por sincício e citotrofoblasto são invadidos internamente pelo mesoderma extraembrionário dando origem às vilosidades coriônicas (BOYD; HAMILTON, 1970).

A invasão dos vasos capilares ao redor do embrião pelo sinciotrofoblasto forma uma superfície de interação materno-embriônica, diretamente com o sangue materno. Após a 3ª semana de gestação, angiogênese induzida pelo alantoide leva à formação dos vasos umbilicais, tornando o mesoderma extraembrionário vascularizado e dando início a formação da placenta (BOYD; HAMILTON, 1970).

Parte das vilosidades coriônicas alcança o estroma endometrial, denominado de decídua, formando os vilos de ancoragem (**Figura 1**). Nas extremidades dessas vilosidades há proliferação das células citotrofoblásticas, que extrapolam os limites do sinciotrofoblasto e adentram o endométrio, as células citotrofoblásticas extravilosas. Diferentes populações celulares com funções específicas se formam a partir dessas células. Relevante, são as células citotrofoblásticas extravilosas (CTEV) endovasculares, que substituem as células musculares e endoteliais das

artérias espiraladas uterinas, transformando essas artérias em vasos de baixa resistência (PARIA et al., 2001). Células citotrofoblásticas extravilosas intersticiais invadem a decídua e interagem com diferentes populações de células maternas, desempenhando funções importantes na imunoregulação da gestação (2008; WICHEREK et al., 2009).

Evidências mostraram que a renovação do sinciciotrofoblasto (HUPPERTZ, 2008) ocorre na medida em que incorpora novas células citotrofoblásticas e libera aglomerados de núcleos apoptóticos, denominados de nós sinciciais. Nas fases mais avançadas da gestação, o citotrofoblasto mostra-se bastante reduzido; nas vilosidades de uma placenta a termo, é quase inexistente (GUIBOURDENCHE et al., 2009; VON RANGO, 2008).

1.2 A Placenta: Estrutura e Funções

A placenta estabelece uma interface entre mãe e feto e desempenha funções cruciais ao longo de toda a gestação. Em humanos é do tipo hemocorial, o que significa que o córion, formado pelo trofoblasto e o mesoderma extra-embriônico, está em contato direto com o sangue materno, permitindo trocas moleculares entre eles. Além disso, a presença do CTEV na decídua também permite a interação do trofoblasto com diferentes componentes maternos presentes no endométrio e miométrio (CHARNOCK-JONES et al., 2004). A placenta ainda sintetiza e secreta inúmeros hormônios e moléculas reguladoras e atua como barreira imunológica entre a mãe e feto (MYATT et al., 2010).

Figura 1 – Vilosidade coriônica e suas relações com o endométrio

O esquema mostra o ápice de uma vilosidade coriônica humana, onde está representado o sinciotrofoblasto, as células do citotrofoblasto viloso, o mesoderma extraembrionário com macrófagos e vasos fetais (FC). No ápice da vilosidade notar o crescimento de células citotrofoblásticas (CTEV) em direção à decídua. Células citotrofoblásticas extravilosas intersticiais são mostradas em contato com as células deciduais. Células do trofoblasto endovascular são observadas revestindo parte de um vaso arterial uterino.

Fonte: Adaptado de GUIBOURDENCHE et al., 2009.

A placenta humana a termo (**Figura 2**) é discóide, mede de 15 a 25 cm de diâmetro, cerca de 3 cm de espessura e pesa em média 600 g (SADLER, 2004). Macroscopicamente apresenta duas faces: i) a face materna, aonde são encontrados 15 a 20 cotilédones - vilos coriônicos recobertos por uma delgada camada de decídua basal e separados entre si por septos deciduais. ii) a face fetal, região basal da placenta denominada de placa coriônica e recoberta pelo âmnio. Esta região apresenta grandes vasos (artérias e veia) e a inserção do cordão umbilical.

Os espaços entre as vilosidades coriônicas, repletos de sangue materno, são denominados de espaços intervilosos. O sangue que circula nesses espaços é oriundo dos capilares fetais abertos pelo sinciotrofoblasto no início da gestação e, a partir da 12ª semana de gestação contem sangue arterial que chega a placenta através das artérias espiraladas remodeladas pelo citotrofoblasto endovascular (HUPPERTZ, 2008).

Figura 2 – Esquema mostrando as características estruturais da placenta humana

Representação das características estruturais da placenta humana a termo.
Baseado em: Kierszenbaum A.L., Histologia e Biologia Celular 2004.

1.2.1 Vilosidades coriônicas

A formação das vilosidades coriônicas se inicia na segunda semana de gestação, durante o processo de implantação embrionária. As vilosidades denominadas de primárias são aglomerados de células citotrofoblásticas que crescem e empurram o sinciotrofoblasto formando protuberâncias digitiformes que se projetam para lacunas preenchidas com sangue materno e que formarão futuramente, o espaço intervilosos. Ao fim desta semana do desenvolvimento, as células do mesoderma extraembrionário da placa coriônica

penetram nestas projeções (HUPPERTZ, 2008), que passam a ser designadas como vilosidades secundárias. Neste mesênquima, ocorre hemopoiese e vasculogênese. Por volta do dia 20 após a concepção, capilares fetais formam um sistema vascular complexo e a vilosidade passa a ser denominada de terciária ou madura (DEMIR, 1989; DEMPSEY, 1972).

Durante o processo de formação das vilosidades, parte delas alcança e se ancora no endométrio (**Figura 3**). Essas vilosidades de ancoragem ramificam-se e dão origem aos vilos flutuantes no espaço intervilloso. Os vilos são classificados de acordo com seu grau de maturidade, seu calibre, características do estroma mesenquimal, estruturas vasculares e morfologia (BOYD; HAMILTON, 1970).

Figura 3 - Esquema mostrando a estrutura das vilosidades coriônicas de uma placenta humana

Na placenta a termo, os troncos vilosos estão ramificados formando numerosas vilosidades flutuantes que se projetam nos espaços intervillosos. As ramificações dos troncos vilosos formam as vilosidades intermediárias e as vilosidades terminais. Baseado nas descrições de HUPPERTZ, 2008.

Os primeiros vilos a se formarem no início da gestação são denominados de mesenquimais. Apresentam diâmetro de 100 a 250 μm e predominam até a 6ª semana de desenvolvimento. O estroma desses vilos possui células mesenquimais e capilares em formação (CASTELLUCCI et al., 1990). Algumas dessas vilosidades podem ser encontradas na placenta a termo, mas devido a sua diferenciação em vilos intermediários, seu número torna-se extremamente baixo após o primeiro trimestre de gestação (HUPPERTZ, 2008).

O desenvolvimento dos vilos mesenquimais dá origem aos vilos intermediários, cujo diâmetro varia de 100 a 3.000 μm . São, portanto, maiores e predominam a partir da 8ª semana de gestação (KAUFMANN et al., 1979). Essas vilosidades possuem células mesenquimais com longos processos citoplasmáticos e um grande número de macrófagos (células de Hofbauer). Nas vilosidades intermediárias são observadas artérias, arteríolas, veias e vênulas. Ao longo da gestação, sua quantidade diminui e somente algumas podem ser encontradas nas placentas a termo (CASTELLUCCI et al., 1990; DEMIR et al., 1997; HUPPERTZ, 2008; KOHNEN et al., 1996). Especula-se que esses vilos tenham baixa atividade nas funções de trocas materno-fetais (GRAF et al., 1994; KOHNEN et al., 1996). Suas ramificações finais dão origem às vilosidades terminais. Essas vilosidades medem cerca de 100 mm de comprimento e 80 mm de diâmetro (CASTELLUCCI et al., 1990) e sua característica mais importante é o seu elevado grau de capilaridade. Fazem parte da barreira placentária, contendo as camadas que separam o sangue materno do fetal, o que os tornam fisiologicamente os componentes mais importantes da placenta humana. Muitos dos capilares dos vilos terminais são sinusoides que, associados ao sinciotrofoblasto, formam a membrana vasculosinicial (separando a circulação materna da fetal), com uma espessura de 0,5 a 2,0 mm (HUPPERTZ, 2008).

1.2.2 Componentes vilosos

As vilosidades coriônicas são completamente revestidas pelo sinciotrofoblasto. Dependendo da fase da gestação (até pelo menos o 5º mês de gestação), o sinciotrofoblasto mantém contato direto com a camada de células individualizadas, o citotrofoblasto viloso, que por sua vez repousa sobre uma membrana basal, que separa o trofoblasto do estroma mesenquimal (HUPPERTZ, 2008).

1.2.2.1 Citotrofoblasto

O citotrofoblasto viloso mantém contato com a membrana basal e com o sinciotrofoblasto em suas regiões basal e apical, respectivamente. Quando estas células perdem o contato com a membrana basal - o que ocorre durante a

invasão endometrial - adquirem fenótipo migratório e são denominadas de extravilosas (HUPPERTZ, 2008).

No primeiro trimestre de gestação, o citotrofoblasto viloso está presente como uma camada de células completa abaixo da camada sincicial. Nas fases subsequentes há uma gradual redução em número dessas células, tornando essa camada incompleta e praticamente ausente nas fases finais da gestação (MAYHEW et al., 1999). Estas células se apoiam sobre uma membrana basal que atua como suporte e como uma barreira de filtração entre o sangue materno e a circulação fetal (KASZNICA; PETCU, 2003).

Células citotrofoblásticas indiferenciadas estão presentes nas vilosidades coriônicas, principalmente nas regiões mais próximas à placa coriônica. Essas células exibem forma cubóide com poucas organelas em seus citoplasmas (BURTON et al., 2003; JONES; FOX, 1991). Células diferenciadas, ao contrário, apresentam grande número de mitocôndrias e citoplasma repleto de ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso, o que indica grande atividade sintética (HOSHINA et al., 1985). Estas células fusionam-se para formar o ou para aumentar a área do sinciciotrofoblasto, tornando-se desta forma, parte integrante da camada sincicial juntamente com suas organelas, proteínas e ácidos nucleicos (BENIRSCHKE et al., 2006).

Nas extremidades dos vilos de ancoragem, as células do citotrofoblasto viloso proliferam e extrapolam os limites do sinciciotrofoblasto formando colunas de células com atividade migratória que invadem o estroma endometrial, o citotrofoblasto extraviloso.

1.2.2.2 Sinciciotrofoblasto

O sinciciotrofoblasto é uma camada multinucleada e polarizada que faz contato direto com o sangue materno, por meio de sua superfície apical com microvilosidades. Há um único sinciciotrofoblasto em cada placenta, envolvendo todas as árvores vilosas, a placa coriônica e a basal. É uma camada contínua, mas dependendo do local, apresenta alterações no conteúdo e distribuição de suas organelas e de vesículas de pinocitose e corpos densos (JONES; FOX, 1991). Suas

microvilosidades amplificam a superfície desta camada sincicial cerca de sete vezes (OCKLEFORD; WAKELY, 1981).

Esta camada não apresenta atividade proliferativa e uma reduzida taxa de atividade transcricional (HUPPERTZ et al., 1999), de modo que sua manutenção depende da incorporação de células do citotrofoblasto ao longo da gestação (KAUFMANN et al., 1983). Núcleos do citotrofoblasto, incorporados ao sinciotrofoblasto por fusão sincicial, sofrem alterações morfológicas. Estas alterações, que perduram por 3 a 4 semanas, tornam os grandes núcleos ovoides ricos em eucromatina em núcleos menores e com a cromatina densamente arranjada. Nos estágios finais dessas alterações tem se observado agregação da cromatina, indicando fases finais do processo de morte por apoptose (HUPPERTZ, 2008). A agregação desses núcleos é denominada de nós sinciciais; esses agregados são liberados na circulação materna (HUPPERTZ, 2008).

Após o 5º mês de gestação a camada de citotrofoblasto viloso torna-se escassa e grande parte do sinciotrofoblasto entra em contato direto com a membrana basal que o separa dos capilares fetais, tornando a barreira placentária mais delgada. Em algumas dessas regiões, a barreira torna-se ainda mais adelgada, sendo constituída por uma fina lamela do sinciotrofoblasto, medindo de 0,5 a 1 µm de espessura, sem núcleos e pobre em organelas, estreitamente associada ao endotélio dos capilares fetais (FOX; BLANCO, 1974; SCHIEBLER; KAUFMANN, 1969). Esta região é denominada de membrana vasculosincicial e foi inicialmente identificada por Bremner (1916). As membranas basais do trofoblasto e do capilar fetal mantêm-se intimamente aposicionadas ou até mesmo fusionadas. Estas áreas estão especialmente envolvidas com a transferência molecular de nutrientes, dejetos metabólicos, gases e água entre mãe e feto.

1.2.2.3 Células mesenquimais

Até o final do segundo mês de gestação, predominam no estroma viloso, células mesenquimais indiferenciadas (MARTINOLI et al., 1984). Estas células são geralmente pequenas (10-20 nm de comprimento), fusiformes, com citoplasma escasso preenchido em grande parte por polirribossomos e estabelecem contatos entre si por meio de finos e longos prolongamentos. Estas células são as

precursoras de todos os outros tipos celulares que se formam no estroma (DEMIR et al., 1997; KOHNEN et al., 1996).

A diferenciação das células mesenquimais em fibroblastos ocorre na medida em que as vilosidades intermediárias se formam, no início do terceiro mês de gestação (KAUFMANN et al., 1972). Estas células passam a expressar desmina como filamento adicional do citoesqueleto (KOHNEN et al., 1995, 1996), apresentam corpos celulares alongados e medem cerca de 20 a 30 nm de comprimento. Células mesenquimais também dão origem a miofibroblastos. Estas células apresentam abundante citoplasma, medem de 30 a 100 nm de comprimento, têm poucos processos citoplasmáticos e citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso. Diferentemente das células musculares lisas vasculares, os miofibroblastos estão dispostos paralelamente ao maior eixo das vilosidades (DEMIR et al., 1997). Em grandes vilosidades, eles formam uma bainha contrátil (GRAF et al., 1994, 1997), cuja contração pode influenciar o comprimento dos vilos de ancoragem e a largura do espaço intervilos, regulando assim a pressão arterial intravilosa (DEMIR et al., 1997; KOHNEN et al., 1996).

A partir das células mesenquimais também se diferenciam células grandes, com função fagocítica, denominadas de células de Hofbauer (HBCs) (investigador que as descreveu em 1925, morfológica e funcionalmente). Estas células, com formato arredondado, fusiforme ou estrelado, variam de 10 a 30 μm de diâmetro, apresentam citoplasma altamente vacuolizado e granuloso (ENDERS et al., 1970). Elas são observadas nas vilosidades coriônicas após o 18º dia do desenvolvimento, e em condições saudáveis tornam-se menos numerosas após o quinto mês de gestação. Em placentas cujas gestantes desenvolvem alguma patologia, como no *diabetes mellitus*, vilite de etiologia desconhecida e na corioamnionite, observa-se hiperplasia e hipertrofia destas células (KONDI-PAFITI et al., 2013; TANG et al., 2011; WYNN et al., 1967). A função primordial dessas células parece ser a fagocitose de corpos apoptóticos e de debris celulares e a apresentação de antígenos em resposta a inflamação e agentes infecciosos. No entanto, como esses processos são modulados nessas células ainda não está elucidado (TANG et al., 2011). Estudos recentes também atribuem um papel chave para essas células no desenvolvimento placentário atuando na regulação da

angiogênese, na vasculogênese e na maturação mesenquimal (INGMAN et al., 2001; KHAN et al., 2000). Essas células possuem inúmeros receptores em sua superfície, dentre eles, os que se correlacionam com a *diabetes* e a inflamação são os receptores semelhantes ao receptor *Toll* (*TollLike Receptor*, TLR) 2 e 4.

1.3 Hiperglicemia na Gestação

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem crônica que altera o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (ADA, 2015). Caracteriza-se por hiperglicemia crônica, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina, acarretando consequências em longo prazo (GROSS et al., 2000). Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de *Diabetes* (2014-2015), estima-se que a população mundial com *diabetes* é de aproximadamente 382 milhões de pessoas, atingindo possivelmente 471 milhões em 2035. (SBD, 2015). Já no Brasil, cerca de 7% das gestações são complicadas por algum distúrbio hiperglicêmico (SBD, 2015). As *diabetes* são classicamente classificados em DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2) e DM gestacional (DMG). Ainda, a hiperglicemia gestacional leve que também ocorre durante a gestação vem sendo considerada uma patologia de consequências relevantes, nas ultimas décadas (METZGER et al., 2002; RUDGE et al., 1990; 2005; 2013). Resultados obtidos nos últimos 20 anos no Serviço de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp evidenciaram um risco atribuível de morte perinatal de 6,12% nas gestações complicadas pelo diabetes gestacional ou clínico e de 4,16% nas associadas à hiperglicemia gestacional leve (RUDGE et al., 2005).

Independentemente da classificação, o aumento progressivo da resistência à insulina na gestação e a redução da capacidade das células β pancreáticas de secretar insulina são fatores importantes na patogênese da hiperglicemia materna, de qualquer tipo ou intensidade. A resistência materna à insulina é inerente à gestação em decorrência da ação dos hormônios placentários diabetogênicos (lactogênio placentário, progesterona, cortisol e outros) sobre o metabolismo materno (ADA, 2010; RUDGE et al., 1990).

1.3.1 Diabetes Mellitus tipo 1 e tipo 2 (DM1, DM2)

Segundo a ADA, 2015, o *diabetes mellitus* 1 é caracterizado pela destruição das células β , geralmente levando à deficiência absoluta de insulina. Na maioria dos casos, essa destruição é mediada por autoimunidade, mas podemos também observar casos de diferente etiologia, que são considerados uma forma idiopática de DM1 (SBD, 2015). A incidência de DM1 na população é de 5 a 10 % (ADA, 2015).

O DM2 caracteriza-se por defeitos na ação e secreção de insulina e está presente em aproximadamente 90% dos casos de *diabetes* no mundo (ADA, 2015). Pacientes com DM2 podem apresentar sobrepeso ou obesidade e sintomatologia em qualquer idade, embora o mais comum é que ocorra após os 40 anos (SBD, 2015). Em geral esses pacientes não necessitam de insulina exógena, embora possam utilizá-la como controle metabólico ocasionalmente (SBD, 2015).

O tipo de *diabetes* possui impacto distinto ao longo da gestação e no desenvolvimento fetal. Maior comprometimento é observado quando o diabetes é pré-gestacional, sendo ele do tipo DM1 ou DM2, o que implica em níveis metabólicos comprometidos desde a fertilização. Nesses casos, pode haver comprometimento da organogênese elevando o risco de aborto e malformações congênitas, principalmente quando não há um controle adequado da glicemia materna (RAY, 2001).

1.3.2 Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)

Disfunções glicêmicas são atualmente, as alterações metabólicas mais comuns na gestação, e o *diabetes mellitus* gestacional (DMG), a forma mais prevalente. O DMG é caracterizado pelo quadro de intolerância a glicose, com início ou primeira identificação no segundo ou terceiro trimestre de gravidez, podendo persistir após o parto, evoluindo para DM2 (ADA, 2015; BUHANAN et al., 2007). De acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de *Diabetes* (2014/2015), a ocorrência da DMG pode variar de 1 a 14% em relação ao total de gestações, dependendo da população estudada, e relaciona-se com aumento de morbidade e mortalidade perinatais (MACINTOSH et al., 2006), macrosomia (CALDERON et al., 2006) e, hipertrofia das células beta-pancreáticas, associadas a crises hipoglicêmicas e

hiperbilirrubinemia ao nascimento (CALDERON, 2006; LOWE et al., 2012; RIZZO, 1995).

O DMG é geralmente diagnosticado no segundo trimestre da gestação, afetando principalmente o crescimento do feto (FETITA, 2006). A mulher que já manifestou DMG tem alto risco de desenvolver DM2 após a gravidez (KAHN, 2000; KIM, 2002), assim como hipertensão, aterosclerose, doenças coronarianas e dislipidemias. Estudos também mostram que mulheres que tiveram DMG têm um risco aumentado de 17% a 63% de desenvolver estas patologias 5 a 16 anos após o parto (ACOG, 2000; INNES, 1999).

Gestações complicadas por DM/DMG e/ou obesidade têm sido frequentemente associadas a um aumento de moléculas inflamatórias, caracterizando uma inflamação crônica, que culmina, muitas vezes em gestações com prematuridade extrema. Acredita-se que o tecido adiposo materno e o placentário contribuam para a produção destas moléculas (ADA, 2015; SBD, 2015).

1.3.3 Hiperglicemia Gestacional Leve (HGL)

Nas gestações complicadas por hiperglicemia, as alterações maternas, placentárias e fetais não são restritas às mulheres portadoras de DM, pré-gestacional (DM1 e DM2) ou gestacional (DMG). Elas ocorrem, também, em gestantes com níveis glicêmicos inferiores aos limites definidos para o DMG, quadro reconhecido na literatura atual como hiperglicemia gestacional leve (HGL) (ADA, 2010; METZGER et al., 2008; RUDGE et al., 1990).

Gestantes portadoras de HGL foram identificadas por Rudge em 1983 (RUDGE et al., 1983; 1990), quando associou o teste oral de tolerância à glicose de 75 g (TTG-75 g) ao perfil glicêmico (PG), aplicados em paralelo, em todas as gestantes com risco de desenvolver DMG. As respostas a estes dois testes diferenciaram o DMG e/ou DM2 da HGL. As gestantes do grupo HGL, apesar de apresentarem o Teste de Tolerância à Glicose (TTG-75 g) dentro dos limites da normalidade, tiveram resultados alterados no Perfil Glicêmico (PG). No grupo HGL, a mortalidade perinatal é 10 vezes maior que nas gestantes não diabéticas e a incidência de recém-nascidos macrossômicos ou grandes para idade gestacional (GIG) é

estatisticamente semelhante à observada nas gestantes diabéticas (RUDGE et al., 1990, 2000). Estas gestantes são desta forma, incluídas no grupo de gestantes diabéticas e também seguem protocolo de tratamento diabético.

As gestantes portadoras de hiperglicemia leve têm as mesmas repercussões perinatais do diabetes gestacional e correspondem a 13,8% da população de gestantes rastreadas que, somados aos 7% das gestações complicadas por *diabetes*, aumentam a ocorrência de distúrbios hiperglicêmicos na gestação para cerca de 20% (RUDGE et al., 1996). Em uma pesquisa realizada pelo Serviço Especializado em diabetes e gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu, constatou-se um risco atribuível de morte perinatal de 6,12% nas gestações complicadas pelo diabetes gestacional ou clínico (diabetes pré-gestacional) e de 4,16% nas associadas à hiperglicemia leve (RUDGE et al., 2005). Entre os fatores envolvidos nesse desfecho adverso destaca-se a hipóxia intrauterina, relacionada à hiperglicemia materna, com conseqüentes alterações placentárias. Assim, o controle glicêmico materno e o diagnóstico da hipóxia intrauterina são decisivos na prevenção de morte fetal em gestações associadas ao DM ou ao HGL (RUDGE et al., 2005).

1.3.4 Alterações Placentárias nos Distúrbios Hiperglicêmicos

Nas gestações complicadas por DMG e HGL ocorrem alterações na anatomia e fisiologia da placenta. Estas alterações também se baseiam em mudanças micro-anatômicas e moleculares que incluem o aumento da vascularização das vilosidades, desbalanço na expressão de moléculas vasoativas e intenso estresse oxidativo, entre outros (CALDERON et al., 2007; PIETRO et al., 2010). As conseqüências placentárias, desta forma, parecem ser um fator comum a todo tipo de desordem hiperglicêmica, com prejuízo na oxigenação e na oferta de nutrientes ao feto. Embora o fluxo de glicose transplacentária independa da disponibilidade de transportadores de glicose, o transporte de aminoácidos essenciais e não essenciais e a expressão de genes envolvidos no metabolismo e transporte lipídico são profundamente afetados no DMG (GAUSTER et al., 2011). A inflamação do tecido

placentário tem sido observada em gestações complicadas por DMG e pode ter papel central no desenvolvimento fetal nesta condição.

Placentas de gestantes com HGL têm densidade absoluta (DEL NERO et al., 2002), maior incidência de endarterite (LIMA, 1998), maior número de vilosidades e vasos vilositários, garantindo a maior superfície de troca materno-fetal (CALDERON, 2003; CALDERON et al., 2007). Aparentemente estas modificações refletem adaptações necessárias para manter a capacidade funcional da placenta, facilitando a passagem de glicose para o feto e determinando a macrosomia fetal, ao contrário do que ocorre no DM (gestacional ou clínico). Recente estudo mostrou que alterações na razão de TNF- α / IL-10 no soro e na placenta com predominância para o TNF- α estavam correlacionadas com a severidade da hiperglicemia durante a gestação, podendo estar associada às intercorrências gestacionais (MORELI et al., 2015).

1.4 Hiperglicemia e Inflamação durante a Gestação

O aumento dos níveis de biomarcadores e mediadores da inflamação, tais como fibrinogênio, proteína C-reativa (PCR), inibidor de ativação do plasminogênio-1 (PAI-1), ácido siálico, óxido nítrico, proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), citocinas inflamatórias como o TNF- α e as interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-18, IL-33 entre muitos outros fatores tem sido relatados nos distúrbios hiperglicêmicos durante a gestação (BO et al., 2005; MORELI et al., 2015; PANTHAN et al., 2015; STEINBORN et al., 1996).

Alterações glicêmicas têm sido apontadas como um fator amplificador do perfil inflamatório que persiste durante grande parte da gestação (RETNAKARAN et al., 2010). Gestantes com DMG apresentam concentrações circulantes aumentadas de moléculas inflamatórias, tais como o TNF- α e IL-6 (CONSIDINE, 1996; MACINTOSH, 2006; MORELI et al., 2012). Tem sido atribuído um papel no aumento da resistência à insulina por parte destas citocinas (WIESER et al., 2013). A IL-1 β é uma citocina de característica pró-inflamatória e tem sido sugerido seu envolvimento no processo de glicotoxicidade, diminuição da secreção de insulina, assim como na sua resistência (LATKOVSKIS et al., 2004; MAEDLER et al., 2002, 2006;

VITORATOS et al., 2007). Outras citocinas que são consideradas da família da IL-1 possuem papel no desenvolvimento da DMG e síndrome metabólica.

Kuzmicki et al., (2008) dosando níveis de IL-18 no soro de mulheres com diabetes gestacional, observaram níveis aumentados em relação ao controle saudável, sugerindo uma relação com o padrão inflamatório observado no DM e na obesidade.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* também sugerem um papel para a IL-33 no DM2, como fator protetor associado à redução do estoque de lipídios e à resistência à insulina (MILLER, 2011).

A proteína MCP-1 (também denominada CCL2, um membro da família de quimiocinas CC) é um potente fator quimiotático para monócitos (DESHMANE et al., 2009) e tem sido também apontada como fator chave nos processos angiogênicos (KLEIN et al., 2008) e no recrutamento e ativação dos leucócitos do sangue periférico em lesões ateroscleróticas e do tecido adiposo e, na indução de resistência à insulina sistêmica (TELEJKO et al., 2007). Níveis séricos elevados são encontrados em DM1 e 2. A MCP-1 é expressa e secretada por adipócitos (KANDA et al. 2006) e por uma variedade de células da placenta, incluindo trofoblasto, macrófagos e células T (DENISON et al., 1998).

O óxido nítrico (NO) é um mediador de baixo peso molecular com funções que incluem vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e remodelação vascular. O NO resulta da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que converte a L-arginina, na presença de oxigênio, a L-citrulina e NO (LYALL et al., 1999). O óxido nítrico é um gás solúvel, envolvido na regulação da musculatura lisa vascular, na inflamação, na coagulação e na imunidade mediada por células. Estudos mostram que o NO pode contribuir para a manutenção da gravidez, pelo aumento do fluxo sanguíneo no útero e na manutenção da complacência miometrial (KAKUI et al., 2003). Dentre as três isoformas da NOS, a NOS induzível (iNOS), cálcio/calmodulina independente (MATTILA; THOMAS, 2014), também denominada de NOS2, é considerada um fator mediador da inflamação envolvida na resistência à insulina. Apesar de ter sido originalmente identificada nos macrófagos, é amplamente expressa em muitos tecidos, incluindo órgãos insulino-sensíveis, como músculo esquelético, tecido adiposo e fígado (FUJIMOTO et al., 2005). Na interface materno-fetal é expressa

principalmente nas primeiras etapas da gravidez (KRAUSE et al., 2011). A biossíntese de NO é alta durante a gravidez, conforme mostrado pelos elevados níveis de nitrato na urina e no plasma de gestantes. Este aumento parece ser devido à produção aumentada de NO tanto pelos tecidos periféricos maternos quanto pelo feto e/ou placenta (BAYLIS et al., 1999). Isoformas da NOS também estão ativamente expressas na placenta humana, como mostrado por Myatt (1997). Por meio de reações imunohistoquímicas os autores mostraram a presença de iNOS nas células de Hofbauer, no sinciciotrofoblasto e no endotélio vascular das vilosidades coriônicas.

Um clássico marcador de inflamação é a proteína C-reativa (PCR). A produção hepática aumentada e a elevação da concentração plasmática dessa proteína relacionam-se com a existência de processos inflamatórios, danos teciduais e infecções (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). A PCR faz parte da resposta imunológica inata, desempenhando funções na opsonização de partículas estranhas, ativação da via clássica do sistema complemento, etc. Tem também a capacidade de potencializar a produção de citocinas inflamatórias, como a IL-1 β , o TNF α e a IL-6 em macrófagos periféricos e monócitos sanguíneos (EBERSOLE, 2000). Em geral, a PCR está presente em pequenas quantidades no organismo (<0,5 mg/dL) saudável, podendo aumentar em até mil vezes na ocorrência de inflamação. Durante a gestação, a PCR é um marcador inflamatório dosado no soro de gestantes obesas ou portadoras de pré-eclâmpsia (BERTHA et al., 2013; CABRAL et al., 2002).

1.5 Inflamassoma - Componentes e Ativação

1.5.1 Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados ao Perigo (DAMPs)

As células do sistema imunológico inato, como os monócitos e os neutrófilos, empregam um sistema de vigilância diferente das células do sistema imune adaptativo. Elas monitoram os padrões moleculares específicos associados a patógenos (PAMPs) ou a moléculas liberadas a partir de danos celulares, padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), utilizando receptores de

reconhecimento padrão (PRRs), evolutivamente conservados e absolutamente críticos para a resposta imunológica inata contra agentes patogênicos e para a ativação do sistema imunológico adaptativo, se necessário.

Lipopolissacarídeos, peptidioglicano, flagelina e ácidos nucleicos são moléculas PAMPs com estrutura molecular conservada durante a evolução e que podem atuar como fatores estranhos associados a patógenos, para os eucariotos. Os DAMPs são moléculas endógenas, normalmente encontradas no interior das células, que sob condições de estresse ou injúria podem ser liberadas para o meio extracelular, ativando células do sistema imunológico inato (CHEN et al., 2010). São exemplos de DAMPs o ATP, o DNA mitocondrial, as histonas, os ácidos graxos livres e a glicose (ROVERE-QUERINI et al., 2004; SCAFFIDI et al., 2002). Estas moléculas são reconhecidas por meio de PRRs, dentre os quais os melhores caracterizados são os receptores semelhantes ao receptor *toll* (TLR) capazes de ativar plataformas inflamatórias, como o inflamassoma que desencadeiam a inflamação. O processo inflamatório é crucial para a erradicação de patógenos invasores (PAMPs) e na eliminação de células mortas (ZITVOGEL et al., 2010).

1.5.2 Receptores Semelhantes ao Receptor Toll (TLR)

A proteína *Toll* teve sua primeira identificação em *Drosophila melanogaster*, aonde está envolvida na polaridade dorso-ventral durante a embriogênese (AKIRA; TAKEDA, 2004). Estudos subsequentes mostraram o importante papel dessa proteína na resposta imunológica contra o fungo *Aspergillus fumigatus* e levaram à identificação de homólogos de *Toll* em humanos e camundongos, que foram denominados receptores semelhantes ao receptor *Toll* (TLRs) (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

TLRs são proteínas transmembrana do tipo I com um domínio extracelular formado por repetições ricas em leucina e um domínio citoplasmático homólogo ao receptor da interleucina-1 (TIR) (AKIRA; TAKEDA, 2004). A ativação dos TLRs depende do ligante a que se associa e de sua localização celular, que pode ser superficial ou no interior de compartimentos celulares (AKIRA; TAKEDA, 2004).

Embora este seja um mecanismo de defesa, a ativação inadequada deste receptor pode levar a doenças inflamatórias crônicas.

Um total de 13 TLRs foi já identificado em humanos (DENG et al., 2014). Cada TLR é capaz de detectar e responder a um grande número de agentes patogênicos tais como bactérias, fungos, protozoários e vírus (AKIRA; TAKEDA, 2004). Por exemplo, TLRs 1, 2, e 6 reconhece diferentes moléculas expressas nas superfícies de muitas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micobactérias (CHIANG, 2007; KARLSSON et al., 2004). TLR4 reconhece lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias Gram-negativas (DZIARSKI; GUPTA, 2000) e ligantes endógenos (proteínas de choque térmico, componentes da matriz extracelular) em resposta às lesões teciduais regulando respostas inflamatórias diversas (O'NEILL et al., 2009). TLR 3, 7, e 9 exibem localização endossomal e são capazes de detectar ácidos nucleicos, crucial para a resposta anti-viral (KUZEMTSEVA et al., 2014; NAKAMURA et al., 2014).

TLRs estão presentes em diferentes tipos celulares (linfócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células NK, endotélio, fibroblastos, células tumorais, etc.) e teciduais (ovário, próstata, pâncreas, placenta, testículos, pulmão, fígado e músculo esquelético) (ZAREMBER; GODOWISKI, 2002).

A ligação TLR-ligante (exceto para TLR3) induz a dimerização dos domínios extracelulares, de modo a aproximar também seus domínios citoplasmáticos TIR (presente em todos os TLRs). A dimerização desencadeia uma cascata de sinalização que se inicia com o recrutamento das seguintes moléculas adaptadoras (plataformas que organizam cascatas de sinalização para uma resposta celular específica) ao domínio N-terminal, intracitoplasmático TIR para sua ativação (receptor *Toll* da interleucina-1): fator de diferenciação mieloide 88 (do inglês: MyD88, *myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (também conhecido como MAL, proteína adaptadora contendo domínio TIR semelhante a Myd88, do inglês: *MyD88-adaptor-like*), TRIF (molécula adaptadora contendo domínio TIR indutor de interferon β , do inglês: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) e TRAM (molécula adaptadora relacionada à TRIF, do inglês: *TRIF-related adaptor molecule*) (CHIANG, 2010; LIN et al., 2012). Esses

adaptadores são usados em várias combinações pelos TLR diferentes e levam à ativação de MAPK (*mitogen activated protein kinases*) e fatores de transcrição tais como NF- κ B (fator nuclear κ B) e IRFs (fatores reguladores de Interferon) ativando o sistema imunológico inato e induzindo a produção de citocinas inflamatórias e interferons (IFNs) do tipo I (SHI et al., 2006) (**Figura 4**).

Particularmente o TLR4 pode ser ativado pelo LPS presente na parede bacteriana e por níveis aumentados de ácidos graxos circulantes presentes na obesidade (MASTERS et al., 2011; NGUYEN, 2007). A cascata de sinalização mediada por TLR4-ligante leva à ativação do fator de transcrição nuclear de célula B (NF- κ B), que controla a indução de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, bem como o aumento de moléculas co-estimulatórias nas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos), essenciais para a ativação de linfócitos T (KAWAI; AKIRA, 2007).

Tsukumo (2007) observou que camundongos obesos possuem o aumento da expressão de TLR4 em comparação ao grupo controle não-obeso. Outros autores (DE LUCA, 2008; SHI, 2006) mostraram que camundongos TLR4^{-/-}, ao contrário, não apresentam ativação da via do NF- κ B após infusão lipídica. Nguyen et al., (2007) mostraram que dietas ricas em ácidos graxos livres são capazes de ativar macrófagos do tecido adiposo via TLR4 e TLR2. Recentemente foi mostrado que a estimulação de TLR leva a transcrição de IL-1 β e IL-18, e que tal evento acontece em função da ativação de um complexo denominado inflamassoma (CREAGH; NEILL, 2006).

Também foi recentemente mostrado aumento da expressão de TLR4 dependente de MyD88 em células pancreáticas murinas e em monócitos de pacientes diabéticos, o que também relaciona os altos níveis de glicose à produção de citocinas inflamatórias e à ativação do inflamassoma (DASU et al., 2008, 2010).

Figura 4 - Esquema das principais vias de sinalização dos receptores do tipo *Toll*.

Todos os TLRs sinalizam via MYD88- exceto TLR3- e utilizam diferentes moléculas adaptadoras, como TIRAP, TRIF e TRAM, ativando diferentes fatores, como o NF- κ B e IRF3 (Fator regulador de interferon 3), que regulam a transcrição de genes alvo de citocinas inflamatórias, quimiocinas e IFN- β .

Baseado nas descrições de Chiang, 2010.

1.5.3 Inflamassoma

O inflamassoma é um complexo multiproteico intracelular acoplado a sensores de microorganismos e fatores de estresse tecidual que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (caspases) como uma estrutura essencial para a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18. Este sistema regula a imunidade em condições fisiológicas e em situações de perigo. Caspases executam ou iniciam programas celulares levando à morte celular ou à inflamação (LATZ et al., 2013).

Sendo uma parte importante do sistema imunológico inato, o inflamassoma responde aos sinais de perigo e estresse detectados por diferentes receptores (TLR, por exemplo) e que levam à expressão de interleucinas inflamatórias e receptores intracelulares do tipo NOD (*NOD-like receptors* – NLRs). Diferentes tipos de receptores intracelulares caracterizam diferentes inflamassomas (**Figura 5**), cada um utilizando diferentes vias de sinalização. Os NLRs se organizam e oligomerizam (homo ou heterodímeros), se associam a proteínas adaptadoras (ASC) e a pró-caspase-1 e formam o complexo conhecido por inflamassoma (MARTINON et al.,

2002). Uma vez formado o complexo inflamassoma, ocorre a maturação das interleucinas 1 β e 18, por meio de caspases. Neste mecanismo, a ativação do inflamassoma resulta na própria ativação do processo inflamatório para a resolução do sinal de perigo/estresse ou pode induzir a morte celular (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2007).

Diferentes inflamassomas têm sido identificados na medida em que utilizam proteínas da família NLR associadas a domínios contendo pirina (NLRP, *NOD-like receptor family, pyrin domain-containing*; também chamado de NLRP) como o NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, ou não como o NLRC4 ou outras proteínas (AIM2, do inglês: *absent in melanoma*, IPAF, fator de ativação de protease de enzima conversora de IL-1 β , IFI16) (MAN; KANNEGATI, 2015).

Figura 5 - Organização estrutural do inflamassoma NLRP3, e sua ativação

Fatores externos, tais como DAMPs e PAMPs ativam receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores semelhantes a Toll (TLR), que por sua vez ativam a via do inflamassoma para a produção de citocinas inflamatórias de defesa. Fatores intracelulares também influenciam na ativação desta via. A transcrição de NF- κ B regula o primeiro sinal para a polimerização de NLRP3 com ASC, clivando a pró-caspase-1 em Caspase, tornando-a ativa. As citocinas inflamatórias que foram produzidas através da ativação do NF- κ B em suas formas inativas (pró-IL1 β , pró-IL18) são clivadas pela caspase-1. Após a clivagem das mesmas, estas citocinas são secretadas para o meio externo, participando de outros processos inflamatórios.

A Figura A foi baseada no texto de SHEN et al., 2015.

Figura B: Modificado de Ting et al. *Nature Reviews Immunology*, 2008.

1.6 Inflamassoma e Hiperglicemia

Estudos recentes tem mostrado que tanto a dislipidemia quanto a hiperglicemia podem ativar TLR2 e 4 levando um processo inflamatório característico observado na DM e obesidade, sendo assim um dos mecanismos responsáveis pela ativação da via inflamassoma (LEE, 2011).

Indivíduos com DM2 apresentam aumento da atividade do inflamassoma em células mielóides (LEE et al., 2013). Experimentalmente também foi observado que a deficiência de NLRP3, ASC e / ou caspase-1 melhoram a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina em camundongos, além de reduzir os níveis de citocinas inflamatórias séricas (STIENSTRA et al., 2012). Aumento dos níveis de ácidos graxos saturados circulantes também foi capaz de induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 (WEN et al., 2011). Estes achados relacionam diretamente a formação do inflamassoma NLRP3 e a resistência à insulina, característica da DM e à obesidade.

O inflamassoma NLRP3 tem sido o mais estudado e, dessa forma está melhor caracterizado (DUNNE, 2011; STIENSTRA, 2012). Sua ativação envolve duas etapas: um estímulo para a ativação do NF- κ B (via TLR4, por exemplo) e produção da pró-IL-1 β e para a sua expressão gênica e proteica. Na sequência, NLRP3 deve ser desubiquitinizado para sua associação com a proteína adaptadora ASC (proteína semelhante a partícula associada à apoptose contendo um domínio CARD, do inglês: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). A ligação de NLRP3 com ASC e sua ativação leva à formação do complexo inflamassoma, que necessita de um segundo estímulo (possivelmente oriundos da geração de espécies de oxigênio, da translocação de NLRP3 para a mitocôndria com liberação de DNA mitocondrial ou cardiolipina e a liberação de catepsina no citosol após desestabilização lisossômica) para ativar a caspase-1 que cliva a pró-IL-1 β e a pró-IL-18 em suas formas maduras (FAYYAZ et al., 2014; VANAJA et al., 2014).

O inflamassoma NLRP1 humano foi a primeira plataforma de ativação de caspase-1 a ser identificada (MARTINON et al., 2002). Aparentemente, ASC não é essencial para este processo, ainda que a sua adição potencializa a ação de NLRP1 mediada pela ativação da caspase-1 *in vitro* (FAUSTIN et al., 2007; OPDENBOSCH

et al. 2014). No entanto, diferentemente ao NLRP3, NLRP1 ainda está sendo pouco estudado. Estudos recentes sugerem que a hiperglicemia também é capaz de induzir ao inflamassoma NLRP1, no entanto ainda não foram realizados estudos sobre esta plataforma gestações acometidas por hiperglicemia (MENG et al., 2014; TANG et al., 2013).

1.7 Proposta do Estudo

Este estudo teve como proposta analisar comparar os principais fatores relacionados à via do inflamassoma NLRP1 e 3 em placentas de gestantes com diferentes graus de hiperglicemia. Distúrbios hiperglicêmicos estão sendo classificados como importantes doenças crônico-degenerativas, sendo uma pandemia na população global. Entender as vias de ativação da inflamação gerada nessas condições durante a gestação e na placenta pode abrir novas frentes para o estudo das implicações que se estendem à vida adulta deste feto.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

1. Investigar o perfil inflamatório placentário (região fetal - vilos coriônicos), utilizando marcadores clássicos da inflamação, de gestantes com distúrbios glicêmicos.

2. Investigar a possível participação da via do inflamassoma nos vilos coriônicos de gestantes com distúrbios glicêmicos.

2.2 Específicos

2.2.1 Parte 1

1. Caracterizar o grupo de estudo com base em suas condições clínicas.
2. Investigar os níveis proteicos dos marcadores de inflamação: MCP-1, IL-1 β e IL-6 (ELISA) na placenta de gestantes com distúrbios hiperglicêmicos.
3. Investigar a expressão gênica por RT-PCR dos marcadores de inflamação: iNOS e MCP1.
4. Localizar por imunohistoquímica células presentes nos vilos placentários reativas para os biomarcadores inflamatórios iNOS e MCP-1.

2.2.2 Parte 2

1. Identificar por reações imunohistoquímicas a presença de receptores do tipo TLR-2, TLR-4 e de células CD68 (macrófagos fetais) em cortes seriados da placenta.
2. Investigar a ativação de NF-kB por meio de ensaios de translocação.
3. Avaliar por *Western Blotting* a expressão proteica dos componentes da via do inflamassoma (NLRP1, NLRP3, ASC e caspase-1) em vilos coriônicos de gestantes com distúrbios de glicemia e em vilos coriônicos de gestantes com distúrbios de glicemia e em vilos coriônicos mantidos em cultura e submetidos a diferentes concentrações de glicose.

3.1 Reagentes, equipamentos e procedências

Applied Biosystems® Life Technologies (Carlsbad, EUA): termociclador (7500 Fast Real-Time PCR System), *Dithiothreitol* (DTT), tampão T4 quinase. **Abcam Inc.** (Cambridge, MA, EUA): anticorpos monoclonais anti-TLR2 e TLR4 humanos produzidos em cabra, leupeptina, antipapaína. **Bioamerica Inc.** (Miami, FL, USA): homogeneizador *Precellys*®, kit de homogeneização CK14 *Precellys* 24, esferas de cerâmica de 1,4 mm (03961CK-14). **BD Bioscience** (Franklin Lakes, NJ, EUA): kit de ELISA OptEia™ para IL-1β, e IL-6, placas de 96 poços, tubos Falcon®, membranas de 0,22 µm, tetrametilbenzidina (TMB), anticorpo anti-MCP-1 humano policlonal produzido em cabra. **Biolegend Inc.** (San Diego, CA, USA): anticorpo monoclonal anti Caspase-1 humana produzido em rato. **BIORAD laboratories** (Hercules, CA, USA): *High-performance liquid chromatography* D10™ *Hemoglobin Testing System*, equipamento de transferência úmida, Bradford® *protein assay* Maxisorp®, placa de 96 poços. **Bibby Scientific Ltd** (Staffordshire, UK): banho seco. **Cell Signaling Technology Inc.** (Danvers, MA, EUA): anticorpos monoclonais anti-NLRP1 e anti-NLRP3 humanos, produzidos em Coelho. **Dako** (Carpinteria, CA, EUA): *Liquid DAB + Substrate Chromogen System*, *Ready-to-use peroxidase-based ADVANCE™ kit*. **Enzo Life Sciences, Inc.** (Farmingdale, New York, EUA): Anticorpo anti-iNOS humano produzido em coelho. **Gibco® Life Technologies** (Carlsbad, CA, EUA): DMEM. **GE Healthcare Bio-Sciences** (Amersham, Pittsburgh, EUA): *ECL Detection Kit*. **KPL – Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.** (Washington, DC, EUA): anti-IgG de coelho marcado com peroxidase produzido em cabra, anti-IgG de camundongo produzido em cabra, anti-IgG de cabra marcado com peroxidase produzido em coelho. **Invitrogen™ Life Technologies** (Carlsbad, EUA): anticorpo monoclonal anti-CD68 humano produzido em camundongo, dodecil sulfato de sódio (SDS), acrilamida. **Merck KGaA** (Darmstadt, Alemanha): cloreto de sódio, etanol, Histosec®, peróxido de hidrogênio, metanol, entellan, acetonitrila, sulfeto de amônio. **MICROM International GmbH** (Germany): micrótomo HM200 Ergostar. **Millipore** (Billerica, MA, EUA): membranas de nitrocelulose Immobilon 0,45 µm, anticorpo monoclonal anti-ASC humano produzido em coelho. **Pharmacia LKB Biotechnology** (Uppsala, Sweden): *Polyoxyethylene sorbitan monolaurate - Tween*

20. **Qiagen**[®] (Valencia, CA, EUA): *kit RNeasy Mini*. **R&D Systems Inc.** (Minneapolis, EUA): *quantiquine* MCP-1. **Sigma Chemical Co.** (St Louis, MO, EUA): ácidoetilenodiamonotetraacético (EDTA), albuminasérica bovina (BSA), glicerol, *phenyl methyl sulfonyl fluoride* (PMSF), *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid* (HEPES), resina Sephadex G-25, kit revelador *SIGMA FAST*TM 3,3'-*diaminobenzidine*, paraformaldeído, poli-L lisina, tampão fosfato salina (PBS), tampão tris (TBS), inibidor de protease (# P8340), anticorpo anti-β-actina humana produzida em camundongo. **Syngene** (Cambridge, Reino Unido) Gbox[®]. **LabSynth**[®] Ltda (Diadema, SP, BR): xilol, etanol, azul de bromofenol. **Thermo Scientific / Nunc Brand Products** (Rockford, IL, EUA): *Pierce*[®] *Protein Assay Kit* BCA, microplacas para ELISA 96 poços. **Zeiss** (Mannheim, Germany): microscópio Axioshop2, sistema de captura Axio Vision 4.7.

3.2 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Estudos da Interação Materno-Fetal e da Biologia do Trofoblasto do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) com amostras coletadas no Serviço Especializado de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FMB-UNESP (02597/09-8) e ICB-USP (931.947). Todas as gestantes que participaram do estudo foram informadas sobre os objetivos do trabalho e concordaram com o mesmo, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.3 Local do estudo e seleção das gestantes

As coletas foram realizadas no Serviço Especializado de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, referência para as gestações complicadas por hiperglicemia. As gestantes portadoras de *Diabetes Mellitus* tipo II foram encaminhadas para o Serviço com diagnóstico prévio. As gestantes identificadas com possibilidade de risco para desenvolver o diabetes na gestação

foram submetidas aos testes de tolerância a glicose de 75 g (TTG75 g – ADA, 2012) e perfil glicêmico (PG) (RUDGE, 1983). Os testes foram realizados entre a 24^a e a 28^a semana de gestação e os resultados dos dois testes foram avaliados em conjunto para determinar o tipo de glicemia associada à gestação. Os grupos de estudo foram divididos conforme mostra a **Tabela 1**.

Tabela 1 - Características dos grupos de estudo

Grupo		Características
HGL	Hiperglicemia Gestacional Leve	(TTG75 g normal e PG alterado)
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2	(TTG75 g e PG alterados)
DMG	<i>Diabetes Mellitus</i> Gestacional	(TTG75 g e PG alterados)
ND	Não diabéticas	(TTG75 g e PG normais)

3.4 Definição dos critérios de inclusão e exclusão das gestantes

3.4.1 Critérios de inclusão

- a) Pertencer aos grupos definidos no delineamento do estudo
- b) Realizar assistência pré-natal e obtenção de diagnóstico no Serviço
- c) Ter realizado parto cesariano
- d) Estar de acordo com o uso da placenta e soro para fins científicos e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas gestantes com doenças autoimunes, anemias, *diabetes mellitus* do tipo 1, infecções, patologias placentárias diagnosticadas, gestações gemelares, tabagistas, etilistas, usuárias de drogas ilícitas, gestações com fetos mal formados ou gestantes que entraram em trabalho de parto.

3.5 Caracterização clínica da população de estudo

Após a inclusão no estudo de acordo com o distúrbio glicêmico, as gestantes foram caracterizadas por idade gestacional no momento do parto, ganho de peso na gestação e níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) no terceiro trimestre da gestação. O Laboratório Clínico do HC-FMB/UNESP, realizou as dosagens de HbA1c por

cromatografia (*Hemoglobin Testing System, BIORAD*). As coletas de sangue materno foram realizadas na 34^a semana de gestação. Para isto foram seguidas as orientações protocolares de boas práticas clínicas. A quantidade máxima de sangue coletado foi de 10 mL. As amostras foram devidamente processadas e posteriormente armazenadas para as dosagens de IL-6, IL-1 β e MCP-1 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), descritos no item 3.8.1.

O resultado desta avaliação foi utilizado para comparar o percentual de gestantes com controle glicêmico adequado (HbA1C < 6,5%) e inadequado (HbA1C > 6,5%) (ADA, 2010). Para as gestantes dos grupos DM2, DMG e HGL realizou-se a média aritmética das glicemias plasmáticas dosadas no Perfil Glicêmico. A glicose plasmática foi avaliada pelo método da glicose oxidase (*Glucose – Analyzer II Beckman*).

Os fragmentos placentários foram obtidos imediatamente após o parto e acondicionados em meio próprio para cada experimento realizado conforme a seguir especificado.

3.6 Coleta das amostras de placenta humana

Foi realizada a coleta de placenta humana de acordo com os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e condizentes com as exigências impostas pela Comissão de Ética envolvendo Pesquisa em Seres Humanos das duas instituições envolvidas.

Os fragmentos de placenta (38-41 semanas) foram obtidos após cesárea eletiva ainda no centro cirúrgico. Cotilédones foram removidos e acondicionados em tubo Falcon (BD) contendo tampão fosfato-salina (PBS 0,1M, pH 7,4) a 4 °C. Os mesmos foram fragmentados em regiões representativas da interface materno-fetal (decídua e vilos coriônicos) e sucessivamente lavados em PBS estéril para remoção do sangue. Parte dos fragmentos vilosos isolados foram imediatamente fixados em solução de 4% paraformaldeído (em PBS 0,1M, pH 7,4) para a realização dos testes imunohistoquímicos e parte congelados em nitrogênio líquido para a realização das dosagens de citocinas, avaliação protéica por *Western blotting* e análise da ativação de NF-KB.

3.7 Obtenção de homogenatos de vilos coriônicos

Aproximadamente 50 mg de vilos coriônicos isolados e previamente congelados foram transferidos para tubos de polipropileno de 2 mL contendo tampão com inibidor de protease [20 mmol/L Tris (pH 7,4), 150 mmol/L de cloreto de sódio, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L leupeptina]. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos no gelo. Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 rpm por 20 min, a 4 °C. Após a dosagem e padronização das quantidades de proteína com o kit da Pierce (Nunc Brand Products), o restante do sobrenadante foi armazenado para dosagens por ELISA e avaliação proteica por *Western blotting*.

3.8 Parte 1: Análise do perfil inflamatório nas vilosidades coriônicas nas gestações acometidas por distúrbios glicêmicos

A metodologia a seguir foi delineada para confirmar a condição inflamatória nas gestantes selecionadas para compor os diferentes grupos experimentais e para investigar a presença de um perfil inflamatório nas vilosidades coriônicas nas gestações acometidas por distúrbios glicêmicos.

3.8.1 Dosagem de biomarcadores inflamatórios no ambiente materno e placentário fetal

Para comparar o perfil inflamatório entre o ambiente materno e o placentário, as citocinas IL-1 β , IL-6 e a quimiocina MCP1 foram dosadas no soro materno, em ensaios paralelos aos das vilosidades coriônicas. Os homogenatos de vilos coriônicos e o soro materno foram submetidos a ensaios imunoenzimáticos (ELISA) através de kits específicos conforme descrito a seguir.

Para a avaliação da produção de IL-1 β e IL-6 foi utilizado o kit OptEia™ (BD, Bioscience). Placas de 96 poços (Maxisorp®, BioRad) foram revestidas com o anticorpo de captura anti-IL-1 β e anti-IL-6 na concentração de 1:250 em PBS. A placa foi incubada durante uma noite em câmara úmida e a 4 °C. No dia seguinte, após a lavagem com PBS contendo 0,1% de Tween 20 (Pharmacia LKB), realizou-se o bloqueio de sítios antigênicos inespecíficos com tampão PBS contendo 5% de BSA por 1 hora, à temperatura ambiente. As amostras foram então colocadas na

placa. A placa foi incubada durante uma noite em câmara úmida, a 4 °C. No dia seguinte, após a lavagem, o anticorpo conjugado oriundo do kit conjugado com estreptoavidina foi adicionado e a placa incubada a temperatura ambiente, por 1 hora. Na sequência, TMB (tetrametilbenzidina), um cromógeno, foi adicionado, e em seguida, seu substrato (peróxido de hidrogênio), também foi acrescentado. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico e lida em leitor óptico utilizando-se filtro de 450 nm. A concentração de cada citocina foi calculada em picogramas / mL utilizando uma curva padrão.

Para as dosagens de MCP-1 utilizou-se o *kit Quantiquine* (R&D) em protocolo semelhante, seguindo-se as especificações do fabricante. Os resultados foram calculados através da curva padrão e expressos em pg/mL.

3.8.2 Expressão de biomarcadores da inflamação nos vilos placentários

A expressão de biomarcadores específicos da inflamação foi avaliada no compartimento viloso das placentas dos diferentes grupos de estudo por meio da análise da expressão gênica por qRT-PCR e da imunolocalização de MCP-1. Adicionalmente também foi investigada a expressão da enzima produtora de óxido nítrico, óxido nítrico sintase induzível, iNOS.

3.8.2.1 Expressão gênica de MCP-1 e iNOS

Extração e quantificação do RNA. Para a extração de RNA foi utilizado o *kit RNeasy Mini* (Qiagen®), segundo as instruções do fabricante. Posteriormente, a concentração e a pureza do RNA foi determinada em espectrofotômetro (NanoVue, GE) e, em seguida, o RNA foi armazenado a -80 °C.

Síntese de cDNA para RT-PCR. O cDNA foi confeccionado a partir de 1,0 µg de RNA, utilizando-se a enzima transcriptase reversa do *kit High Capacity* (Applied Biosystems), seguindo-se o protocolo do fabricante. A reação foi incubada a 25 °C por 10 min, posteriormente a 37°C por 120 min e, então permaneceu a 4 °C. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

Uma alíquota de 2 µL foi retirada para determinação da concentração e pureza do cDNA em espectrofotômetro (NanoVue), na absorbância A260 e por meio da relação A260/A280 e A260/230, respectivamente. O cDNA foi fracionado em gel de

agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador.

Análise cDNA por qRT-PCR. Antes de iniciar as análises, o termociclador ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystems) foi calibrado com o *kit* Espectral I *Sequence Detection System*. A padronização para o gene de interesse (iNOS e MCP-1) e para os gene endógeno (β - *actina*) foi realizada com sondas de hidrólise (tipo *Taqman*) marcadas com FAM-MGB ou VIC-MGB.

O RT-PCR foi realizado utilizando sondas e primers TaqMan FAM-MGB, inventariados para os genes iNOS(ensaio Hs01075529_m1) e MCP-1 (ensaio Hs00234140_m1). O gene β -actina foi selecionado para controle endógeno. Para a amplificação, foi usado *Taqman Universal Master Mix* (ABI), em um volume final de 10 μ L para cada reação. Detecção dos ciclos de fluorescência foi realizada no termociclador ABI Prism 7500 Fast, utilizando os seguintes parâmetros de amplificação: desnaturação a 94 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg, e 60 °C durante 60 seg. Controle negativo duplicado (sem cDNA) foi adicionado em cada placa para assegurar a ausência de contaminação. Para o controle, utilizou-se um conjunto de cDNA a partir de indivíduos saudáveis. Todos os controles foram executados simultaneamente com as amostras de teste durante todo o experimento.

3.8.2.2 Imunolocalização de MCP-1 e iNOS

Para esta análise, as amostras foram fixadas em 4% paraformaldeído em tampão PBS e seguiram procedimentos rotineiros para inclusão em Histosec® (Merck). Cortes de 5 μ m foram obtidos em micrótomo (Microm) e aderidos à lâminas de vidro silanizadas.

Após desparafinização e hidratação dos preparados histológicos, as amostras foram submetidas à reação imunohistoquímica, como descrito abaixo.

Realizou-se o bloqueio da atividade enzimática endógena da peroxidase com 3% peróxido de hidrogênio em metanol e, o bloqueio de ligações inespecíficas com 3% BSA por 1 hora em câmara úmida. A incubação dos anticorpos primários, descritos na **Tabela 2**, foi realizada durante uma noite em câmara úmida. No dia seguinte, foram acrescentados os anticorpos secundários (também detalhados na

Tabela 2) durante 60 min., a temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi detectada utilizando-se diaminobenzidina como cromógeno (Sigma). Os cortes foram levemente contrastados com hematoxilina de Mayer (Synth). Nas reações controle foi omitido o anticorpo primário. As reações imunohistoquímicas foram fotografadas e em microscópio de luz convencional e as imagens digitais, quantificadas, utilizando-se o programa ImageJ (v. 1,43, NIH).

Entre cada etapa do processo foram realizadas lavagens com tampão TBS (Sigma). Ao final das reações, as lâminas foram montadas com lamínula de vidro e resina sintética (Entellan, Merck). As amostras foram analisadas em microscópio de luz convencional (Axioskop2, Zeiss) acoplado a um sistema de captura de imagens (Axio Vision 4.8, Zeiss).

Protocolo acima descrito também foi utilizado para investigar a presença de células de defesa nos vilos coriônicos, macrófagos fetais ou de Hofbauer, CD68+. Estas imunolocalizações foram realizadas em cortes seriados em relação aos que localizaram os marcadores inflamatórios. Anticorpos utilizados estão detalhados na **Tabela 2**.

3.8.2.3 Análise estatística

Expressão gênica e proteica aferidas entre grupos hiperglicêmicos e saudáveis foram comparados estatisticamente por meio do teste U-Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. A intensidade da imunomarcção foi comparada por ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett ou teste *t* de *Student* para comparações de pares significativos. Dados de resposta foram apresentados como média $\pm$ SEM.

3.9 Parte 2: Participação da via do inflamassoma nos vilos coriônicos de gestantes acometidas por distúrbios glicêmicos

3.9.1 Imunolocalização de TLR2, TLR4

Fragmentos de placenta fixados e processados conforme descrito no item 3.7.3. Anticorpos primários e secundários utilizados e suas concentrações encontram-se detalhadas na **Tabela 2**.

3.9.2 Atividade nuclear de NF- κ B

Os procedimentos para a extração de proteína nuclear e ensaio de alteração da mobilidade eletroforética foram realizados de acordo com LAPPAS et al. (2002).

Extração de proteína nuclear. Amostras previamente congeladas em nitrogênio líquido foram descongeladas e homogeneizadas em PBS gelado acrescido de inibidores de protease (0,5 M PMSF; 0,5 M DTT; 2 μ g/mL leupeptina; 2 μ g/mL antipapaína) e EDTA (0,1 mM). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 12.000g por 30 seg a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 2 μ g/mL leupeptina; 2 μ g/mL antipapaína) e incubado em gelo durante 10 min. Após este período, as amostras receberam 10% NP-40 e foram em seguida centrifugadas a 12.000 g por 30 seg a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em tampão de extração (20 mM HEPES; 25% Glicerol; 1,5 mM MgCl₂; 300 mM NaCl; 0,25 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 2 μ g/mL leupeptina; 2 μ g/mL antipapaína) e incubado por 20 min em gelo, sendo em seguida centrifugado a 12.000 g (20 min, 4 °C). Nesta etapa, o sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas nucleares determinadas pelo método de Bradford (BioRad). As amostras permaneceram a -80 °C até o momento de uso.

Marcação da Sonda. O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C - 3') foi marcado com a adição de γ -³²P ATP em uma solução contendo Tampão T4 quinase (Life Technologies) e água ultra pura (MilliQ®). Após incubação a 37 °C, por 10 minutos, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina sephadex G-25 (Sigma). A sonda marcada foi aplicada no centro da resina e após centrifugação o eluato foi recolhido. No dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, utilizando-se no ensaio aproximadamente 25.000 cpm/ μ L.

Reação de ligação e corrida do gel. Em tubos de microcentrífuga foram adicionados 4 μ L de tampão de ligação (5mM MgCl₂; 2,5 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 300 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,25 μ g/ μ L PolyIdc; 20% glicerol), 10 μ g de extrato nuclear e água ultra pura (MilliQ®) em quantidade suficiente para 20 μ L de

volume final. Os tubos foram incubados por 20 minutos a temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada; novamente os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de azul de bromofenol (Synth) ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado a um gel de poliacrilamida 5,5%. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida TBE (90 mM TRIS, 90 mM ácido bórico, 1 mM EDTA). A corrida eletroforética foi mantida por 2 horas a 150-160 V e ao final secou-se o gel e em seguida o mesmo foi exposto a filme em cassete a -20°C . Após a revelação, o filme foi escaneado para a captura da imagem, sendo as bandas resultantes quantificadas pelo software ImageJ 1.43.

3.9.3 Expressão proteica de fatores associados à via do inflamassoma

A determinação proteica de NALP1, NALP3, Caspase-1 e ASC em vilosidades coriônicas das gestantes acometidas por distúrbios glicêmicos foi realizada por *Western Blotting*, utilizando-se os anticorpos descritos na **Tabela 2**. Os fragmentos vilosos foram conservados em tampão RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% ácido deoxicolato de sódio em TRIS-HCl, pH 7,5), contendo um coquetel de proteases (PMSF 1 mM, ortovanadato de sódio (Na_3VO_4), 0,45 mg/mL benzamidina, 1 mM leupeptina e 1 mM aprotinina). As amostras foram processadas utilizando-se o homogenizador *Precellys* (Bioamerica) seguida de centrifugação a 11.000 rpm (10 min, 4°C). O sobrenadante foi coletado e 1 μL da amostra foi utilizada para quantificação da proteína total em um espectrofotômetro (ELX 800, Bio-Tek Instruments) com filtro de 562 nm, utilizando-se curva padrão com BSA.

Após a determinação da concentração proteica, 30 μg de proteína de cada amostra foram diluídas em 85 mM tampão TRIS contendo 40 mM DTT, 17% glicerol, 0,1% SDS e 0,4% de azul de bromofenol diluídos em água ultra pura (MilliQ), aonde permaneceram por 5 min a 100°C , em banho seco (*BibbySci*). Em seguida, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5% com SDS-PAGE, a uma voltagem de 120 V e corrente de 20 mA durante duas horas (Mighty Slim SX250 Power Supply, Hoefer). Foram acrescentados 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína por poço.

Após a separação das proteínas, foi realizada a transferência das mesmas para membranas de nitrocelulose (Immobilon 0,45 μ m, Millipore) em um equipamento de transferência úmida (Bio-Rad), a 100 V por 1 hora, para em seguida, ser realizada a técnica de *immunoblot*. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com leite desnatado (1-3%) em TBS contendo 0,1% de *Tween 20* (TBST), pH 7,4, durante uma hora, para bloquear a ligação aos sítios antigênicos inespecíficos.

Em seguida, os anticorpos primários NALP1, NALP3 e Caspase-1 foram incubados por uma noite a 4 °C, sob agitação, diluídos em leite desnatado-TBS-Tween 20. Após lavagens com TBST, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários diluídos em TBST-Tween 20 (**Tabela 2**). Todos os anticorpos secundários foram incubados por uma hora à temperatura ambiente, e a revelação das membranas foi realizada utilizando-se o kit ECL (*ECL Detection Kit*) para a detecção de bandas reativas por quimio- luminescência, captada pelo aparelho GBox[®] (Syngene).

Para normatização das amostras, as mesmas membranas foram incubadas com o anticorpo anti- β -actina humana (Sigma) e posteriormente, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (KPL) em TBST, por uma hora à temperatura ambiente. A análise densitométrica foi realizada pelo programa ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

Tabela 2 - Anticorpos e condições de incubação para reações imunohistoquímicas e ensaios de *Western Blotting*

Imunohistoquímica (animal de origem do anticorpo, empresa)		
Proteína	Anticorpo	Diluição*
MCP-1	Anti-MCP-1 humano policlonal (cabra, R&D)	1:100
iNOS	Anti-iNOS humano policlonal (coelho, Enzo)	1:100
CD68	Anti-CD68 humano monoclonal (camundongo, Invitrogen)	1:100
TLR2	Anti-TLR2 humano monoclonal (cabra, Abcam)	1:67
TLR4	Anti-TLR2 humano monoclonal (cabra, Abcam)	1:67
CD68	Anti-CD68 humano monoclonal (camundongo, Invitrogen)	1:100
IgG coelho	IgG de coelho anti-IgG de cabra (KPL)	1:300
IgG cabra	IgG de cabra anti-IgG de coelho (KPL)	1:300
IgG cabra	IgG de cabra anti-IgG de camundongo (KPL)	1:300
Western Blotting (animal de origem do anticorpo, empresa)		
Proteína	Anticorpo	Diluição**
NLRP1	Anti-NLRP1 humana monoclonal (coelho, Cell Signalling)	1:500
NLRP3	Anti-NLRP1 humana monoclonal (Coelho, Cell Signalling)	1:500
ASC	Anti-ASC humano monoclonal (coelho, Millipore)	1:500
Caspase-1	Anti-Caspase-1 humana monoclonal (rato, BioLegend)	1:250
β-Actina	Anti- β -actina humana (camundongo, Sigma)	1:5000
IgG de cabra	IgG de cabra anti-IgG de coelho (KPL)	1:1000
IgG de cabra	IgG de cabra anti-IgG de rato (KPL)	1:1000
IgG de cabra	IgG de cabra anti-IgG de camundongo (KPL)	1:1500

* Diluição em TBS, 0,02 M, pH 7.4; ** Diluição em TBS-T com 3% de leite desnatado

3.9.4 Cultivo de explantes de vilos coriônicos de placenta humana

Placentas humanas de terceiro trimestre de gestação (38-41 semanas) foram coletadas a partir de partos cesarianos eletivos. Todas as placentas foram coletadas após autorização e obtidas de mulheres saudáveis com pesos dentro dos limites da normalidade, que apresentavam sorologia negativa para doenças infecciosas, gestacionais e glicemia. As placentas coletadas foram transportadas em solução salina gelada com antibióticos.

No laboratório as amostras foram lavadas exaustivamente na mesma solução e dissecadas com o auxílio de um estereomicroscópio em DMEM 1x (GIBCO®), para a obtenção das porções terminais dos vilos. Os explantes vilosos foram cultivados em placas de 48 poços, sendo que cada poço recebeu 10 vilos terminais livres. Ao meio de cultura (DMEM suplementado: 10% soro fetal bovino, 1000 µg/mL penicilina, 0,5 µg/mL gentamicina, 2,5 µg/mL anfotericina, MITOS, 56 µg/mL piruvato, 520 µg/mL lactato e 1% BSA foi adicionado glicose nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 mg/dL. O volume final de cada poço foi de 300 µL. Os ensaios foram realizados em triplicata em dois momentos diferentes. Após 48 horas, os vilos foram coletados e preparados para expressão proteica de NLRP1, NLRP3 e ASC por *Western Blot*, seguindo-se o mesmo protocolo e condições descritas no item 3.9.3.

4 RESULTADOS

4.1 Análise das pacientes dos diferentes grupos de estudo

Características maternas estão resumidas na **Tabela 3**. Não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes entre as mães normoglicêmicas e hiperglicêmicas e entre estas e o grupo controle no que se referiu ao ganho de peso. Mães não-diabéticas foram constituídas de mulheres significativamente mais jovens ($p < 0,05$) do que as mães hiperglicêmicas. Vale ressaltar, no entanto, que a idade avançada é um fator de risco para diabetes. Como esperado, os níveis de glicose no soro aumentaram significativamente em todas as mães hiperglicêmicas, assim como a hemoglobina glicada (HbA1c) nos grupos diabéticos (DMG, DM2). Destaca-se que todas as mães do grupo DM2 e DMG fizeram uso de insulina. Às gestantes com hiperglicemia leve foi solicitado uso de dieta especial com baixo índice glicêmico.

Tabela 3 - Características clínicas da população de estudo

	ND	MGH	DMG	DM2
Idade (anos)	23,54 ± 6,74a ¹	32,05 ± 5,77b ¹	32,27 ± 5,81b ¹	33,11 ± 5,60b ¹
Ganho de peso (Kg)	13,18 ± 3,20	11,47 ± 6,06	10,31 ± 7,98	8,95 ± 4,15
HbA1c (%)	5,35 ± 0,46a ³	5,69 ± 0,77a ³	6,10 ± 0,70 b ³	6,49 ± 0,77b ³
GM (mg/dl)	81,08 ± 8,70a ⁴	96,72 ± 7,30b ⁴	107,20 ± 13,26c ⁴	113,72 ± 19,61c ⁴

Valores com letras sobrescritas diferentes e mesmos índices, diferem significativamente ($p < 0,05$).

4.2 Análise do perfil inflamatório nas gestações acometidas por distúrbios glicêmicos

4.2.1 *Dosagem dos biomarcadores inflamatórios no ambiente materno e placentário fetal*

Para confirmar se todas as gestantes com distúrbios hiperglicêmicos apresentam um quadro de inflamação clínica/subclínica sistêmica, assim como descrito na literatura, foram dosadas as citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 e a quimiocina MCP-1 no soro das pacientes (**Figura 6**).

Níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias foram observados no soro de todas as mães com distúrbios hiperglicêmicos (**Figura 6**), mesmo quando a glicemia não era suficientemente alta para o diagnóstico de *Diabetes Mellitus* (gestantes portadoras de Hiperglicemia Gestacional Leve).

No homogenato dos vilos placentários destas gestantes, os resultados foram semelhantes aos encontrados no soro, com aumento das moléculas inflamatórias no compartimento placentário fetal de mães com distúrbios hiperglicêmicos em relação ao grupo controle não diabético (**Figura 6**).

Figura 6 - Expressão proteica de IL-1 β e IL-6 em soro e porção fetal das placentas de mães saudáveis e com distúrbios hiperglicêmicos

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a avaliação dos níveis de IL-1 β , IL-6 e da quimiocina MCP-1 no soro materno e nos vilos coriônicos da placenta de gestantes dos diferentes grupos de estudo. **ND**: Não diabéticas (n=10); **HGL**: Hiperglicemia gestacional leve (n=13); **DMG**: Diabetes gestacional (n=10); **DM2**: *Diabetes Mellitus* tipo 2 (n=12). Mann-Whitney U-test e Teste *t* de Student. **p*<0,05 em relação ao grupo ND.

4.1.2 Expressão dos biomarcadores da inflamação nos vilos placentários

A expressão gênica dos biomarcadores da inflamação iNOS e MCP-1 foi avaliada por meio de RT-qPCR na placenta dos diferentes grupos. A análise destes dados mostrou aumento da expressão gênica de iNOS na placenta de todos os grupos hiperglicêmicos, mas não de MCP-1 ($p>0,05$) (**Figura 7**).

Figura 7 - Expressão gênica de iNOS e MCP-1 em vilos placentários

Expressão gênica de iNOS (**A**) e MCP-1 (**B**) em vilos placentários, avaliada por RT-qPCR. Houve diferença na expressão de iNOS nas placentas das gestantes hiperglicêmicas em relação ao grupo controle não diabético (ND), mas não houve na expressão de MCP-1. **ND**: Não diabéticas (n=10); **HGL**: Hiperglicemia gestacional leve (n=13); **DMG**: Diabetes gestacional (n=10); **DM2**: *Diabetes Mellitus* tipo 2 (n=12). Mann-Whitney U-test e Teste *t* de Student. iNOS: * $p<0,05$ em relação ao grupo ND.

A imunolocalização de iNOS e MCP-1 também foi realizada em cortes histológicos. A intensidade de reação foi mensurada pelo programa ImageJ (NIH). Na porção vilosa da placenta dos diferentes grupos experimentais observou-se que a reatividade destes fatores foi estatisticamente maior nos grupos com distúrbios hiperglicêmicos (**Figura 8**, $p<0,005$).

Ainda, a análise morfológica desses preparados mostrou que nas placentas de gestantes não diabéticas, a imunomarcagem destas moléculas predominou no sinciotrofoblasto dos vilos coriônicos. Nas placentas de mães com distúrbios hiperglicêmicos, houve maior reatividade destas moléculas em células do mesênquima das vilosidades coriônicas (**Figura 8A**). A grande maioria das células

reativas apresentou grandes dimensões, com projeções citoplasmáticas muitas vezes visíveis e citoplasma geralmente vacuolizado. Particularmente essas células lembravam, por suas características, macrófagos fetais (células de Hofbauer, **Figura 8A**). Cortes seriados em que foi realizada a imunolocalização de CD68 (para células de Hofbauer), mostraram co-localização de células iNOS/MCP1 e CD68 reativas em grande parte das células. A quantificação das células marcadas para CD68 mostrou aumento de reatividade nos grupos hiperglicêmicos, em relação ao grupo saudável (**Figura 8B-D**, $p < 0,005$).

4.3 Participação da via do inflamassoma nos vilos coriônicos de gestantes acometidas por distúrbios glicêmicos

4.3.1 Imunolocalização de TLR2 e TLR4

A imunolocalização de TLR2 e TLR4 foi observada em placentas de mães saudáveis e hiperglicêmicas, no compartimento placentário fetal (**Figura 9**). A reatividade a estes receptores em placenta de gestantes não diabéticas foi observada principalmente no sinciotrofoblasto das vilosidades coriônicas. Nos vilos coriônicos de gestantes com distúrbio hiperglicêmico, a reatividade do sinciotrofoblasto mostrou-se mais fraca, contrapondo-se com a reatividade que surgiu células mesenquimais, no estroma viloso. Estas células apresentaram morfologia semelhante ao das células CD68 reativas. (**Figura 9**).

Ao quantificarmos a intensidade de marcação das imunohistoquímicas de TLR 2 e TLR4, averiguamos um aumento da expressão tecidual de TLR2 em gestantes acometidas por distúrbios glicêmicos (**Figura 9A**), e de TLR4, em gestantes do grupo OB e todos os grupos hiperglicêmicos, sugerindo que a presença obesidade e hiperglicemia, além de alterar a localização dos receptores (como observado na **Figura 8**), também aumenta a expressão dos mesmos nas vilosidades coriônicas.

Figura 8 - Imunolocalização de iNOS, MCP-1 e CD68 na região vilosa de placentas de mães saudáveis e hiperglicêmicas

(A) Imunolocalização de CD68 (**a-d**), iNOS (**e-i**) e de MCP-1 (**j-m**) na região vilosa de placentas de mães saudáveis (ND, **a,e,j**) e com distúrbios hiperglicêmicos (HGL, **b,f,k**; DMG, **c,g,h,i**; DM2, **d,i,m**). **(e)** Notar que nas placentas de gestantes saudáveis, a marcação (coloração marrom) para iNOS predomina no sinciotrofoblasto enquanto que nos grupos hiperglicêmicos (**f-i**), a marcação predomina nas células do mesênquima das vilosidades coriônicas. Padrão similar é observado nas reações para MCP-1 (**k-m**). **(a-d)** A imunolocalização para CD68 mostra células marcadas no mesênquima das vilosidades. Imunoperoxidase, contra coloração com Hematoxilina de Mayer. Aumentos a-b, e, g-m = 40x; c, e-f = 20X. **(B)** Quantificação da imunomarcação de CD68 (**B**), iNOS (**C**) e MCP-1 (**C**). ND: Não diabéticas (n=10); HGL: Hiperglicemia gestacional leve (n=10); DMG: Diabetes gestacional (n=10); DM2: Diabetes Mellitus tipo 2 (n=10). Diferenças significativas em relação ao grupo de gestantes saudáveis ($p < 0,005$). Mann-Whitney U-test e Teste *t* de Student.

Figura 9 - Imunolocalização de TLR2, TLR4 e CD68 na porção fetal da placenta de gestantes saudáveis e hiperglicêmicas

(A) Imunolocalização de TLR2, TLR4 e CD88 na região vilosa de placentas de mães saudáveis (ND), e com distúrbios hiperglicêmicos (HGL, DMG e DM2). Notar que nas placentas de gestantes saudáveis, a marcação para TLR-2 e TLR-4 predomina no sinciotrofoblasto, enquanto que nos grupos hiperglicêmicos, também está presente nas células mesenquimais. Imunoperoxidase, contracoloração com Hematoxilina de Mayer. (B-C) Quantificação da imunomarcação para TLR2 (B) e TLR4 (C) nos vilos de placentas de gestantes saudáveis e com distúrbios hiperglicêmicos. **ND**: Não diabéticas (n=8); **HGL**: Hiperglicemia gestacional leve (n=8); **DMG**: Diabetes gestacional (n=8); **DM2**: *Diabetes Mellitus* tipo 2 (n=8). Diferenças significativas foram encontradas em todos os grupos hiperglicêmicos em relação ao grupo de gestantes saudáveis ($p < 0,005$). Mann-Whitney U-test e Teste t de Student.

4.3.2 Atividade nuclear de NF-kB

A análise dos níveis de atividade de NF-kB no compartimento placentário viloso evidenciou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,005$) para os grupos hiperglicêmicos em relação ao grupo saudável (**Figura 10**).

Figura 10 - Atividade nuclear de NF-kB na região fetal de placentas de mães saudáveis e hiperglicêmicas

Ensaio de translocação nuclear de NF-kB. **ND**: Não diabéticas (n=10); **HGL**: Hiperglicemia gestacional leve (n=10); **DMG**: Diabetes gestacional (n=10); **DM2**: *Diabetes Mellitus* tipo 2 (n=10). Mann-Whitney U-test e Teste *t* de Student. * $p < 0,005$ em relação ao grupo ND.

4.3.3 Expressão proteica de fatores associados à via do inflamassoma

Nossos resultados mostraram aumento significativo na expressão proteica dos componentes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 (**Figura 11A-D**) nos grupos de gestantes hiperglicêmicas em relação ao grupo controle.

Figura 11 - Análise densitométrica da expressão de NLRP1 e NLRP3 no compartimento fetal das placentas de gestantes saudáveis e hiperglicêmicas

Análise densitométrica da expressão de NLRP1 (**A**) e NLRP3 (**B**) de vilos coriônicos de gestantes saudáveis e com distúrbios hiperglicêmicos. Valores de todos os experimentos foram normalizados a partir dos valores encontrados para a β -actina. (**C-D**) Imagens representativas de géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) com a imunolocalização das proteínas NLRP1 e NLRP3. **ND**: Não diabéticas (n=8); **HGL**: Hiperglicemia gestacional leve (n=8); **DMG**: Diabetes gestacional (n=8); **DM2**: *Diabetes Mellitus* tipo 2 (n=8). Mann-Whitney U-test e Teste *t* de Student. * $p < 0,05$ em relação ao grupo ND.

Em relação à expressão proteica de ASC e Caspase-1 em homogenatos da porção fetal de placenta humana dos respectivos grupos, observou-se aumento significativo da expressão na placenta de gestantes portadoras de *diabetes mellitus* gestacional e tipo II ($p < 0,005$). Nas placentas de gestantes hiperglicêmicas (HGL) não houve diferença estatisticamente significativa na expressão destes fatores, em relação ao grupo controle (**Figura 12**).

Figura 12 - Análise densitométrica da expressão de ASC e caspase-1 no compartimento fetal das placentas de gestantes saudáveis e hiperglicêmicas

Análise densitométrica da expressão de ASC (**A**) e Caspase-1 (**B**) de vilos coriônicos de gestantes saudáveis e com distúrbios hiperglicêmicos. Valores de todos os experimentos foram normalizados a partir dos valores encontrados para a β-actina. (**C-D**) Imagens representativas de géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) com a imunolocalização das proteínas ASC (n=8) e CASPASE-1 (n=2). Não houve diferença estatística significativa entre o grupo HGL e controle. Caspase-1 necessita de um maior número de amostras para realizar a estatística. **ND**: Não diabéticas (n=8); **HGL**: Hiperglicemia gestacional leve (n=8); **DMG**: Diabetes gestacional (n=8); **DM2**: *Diabetes Mellitus* tipo 2 (n=8). Mann-Whitney U-test e Teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo ND.

4.2.4 Avaliação da influência da hiperglicemia sobre a presença das proteínas associadas ao inflamassoma

Neste experimento realizamos a cultura de vilos placentários provenientes de mães saudáveis normoglicêmicas, com o intuito de observar a influência da glicose sobre a expressão das proteínas do inflamassoma (**Figura 13**). Para isso, os vilos foram estimulados com concentrações crescentes de glicose (100, 200, 300 e 400 mg/dL) por 48 horas.

A análise da expressão proteica de NLRP1 e NLRP3 por Western Blot, mostrou aumento significativo de ambas as proteínas nos explantes estimulados com 400 mg/dL de glicose. A proteína ASC apresentou aumento em seus níveis nos explantes estimulados com 300 e 400 mg/dL de glicose (**Figura 13**).

Figura 13 - Análise densitométrica de NLRP1, NLRP3 e ASC em explantes de vilos

coriônicos de gestantes saudáveis cultivados com diferentes concentrações de glicose

Análise densitométrica da expressão de NLRP1 (**A**), NLRP3 (**B**) e ASC (**C**) de explantes de vilos coriônicos de gestantes saudáveis cultivados com diferentes concentrações de glicose (100 a 400 mg/dL). Valores de todos os experimentos foram normalizados a partir dos valores encontrados para a β -actina. (**a-c**) Imagens representativas de géis de poliácridamida (SDS-PAGE) com a imunolocalização das proteínas NLRP1 (**a**), NLRP3 (**b**) e ASC (**c**). Houve aumento significativo da expressão proteica de NLRP1 e NLRP3 somente em altas concentrações de glicose (**A-B**) enquanto que a proteína ASC (**C**) apresentou-se aumentada nas concentrações de 300 e 400 mg/dL. (n=3). Mann-Whitney U-test e Teste *t* de Student. * $p < 0,05$ em relação à concentração de 100 mg/dL de glicose.

5.1 Características clínicas das gestantes

A análise do perfil das gestantes pertencentes aos grupos de estudo, confirmou as características diabetogênicas nessas mulheres e permitiu comparar os níveis de glicemia e de hemoglobina glicada entre os diferentes grupos. Como já mostrado em outros estudos, o perfil glicêmico e os valores obtidos para a hemoglobina glicada foram semelhantes entre as gestantes com DMG e DM2 (CHAVES et al., 2010), enquanto que as gestantes com hiperglicemia gestacional leve mostraram alterações no perfil glicêmico, mas não na hemoglobina glicada. Achados semelhantes foram avaliados na mesma população foram discutidos previamente por Moreli e colaboradores (MORELI et al., 2015).

Essa análise também mostra uma diferença de idade entre as gestantes do grupo controle e hiperglicêmicas. As pacientes pertencentes ao grupo ND eram relativamente mais jovens do que as gestantes dos grupos hiperglicêmicos, enfatizando que idade elevada é um dos fatores de risco clássicos para o desenvolvimento do *diabetes* (ADA 2015; MORELI et al., 2015).

5.2 Houve relação entre hiperglicemia e o aumento de moléculas pró-inflamatórias no soro materno e no compartimento fetal placentário

Nossos resultados mostraram uma relação entre os níveis séricos e/ou placentários das moléculas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, iNOS, MCP-1 e PCR e as gestações acometidas por distúrbios hiperglicêmicos. O aumento nos níveis ou expressão de muitas dessas proteínas pró-inflamatórias também ocorreu no grupo hiperglicêmico leve, o que coloca a hiperglicemia mesmo em uma condição mais amena do que a observada na diabetes como um agente capaz de desencadear inflamação, que mesmo subclínica deve ser alvo de atenção. Nossos resultados corroboram com estudos prévios, que também evidenciaram comportamentos diferenciados na produção de citocinas inflamatórias no sangue materno e placenta de gestações acompanhadas de hiperglicemia. A produção dessas moléculas é proporcional à gravidade do quadro clínico materno e, conseqüentemente, aos níveis de hiperglicemia (MORELI et al., 2012, 2015).

No entanto, nosso estudo também mostrou o aumento desses marcadores na porção fetal da placenta, o que sugere que as alterações maternas induzidas pela

hiperglicemia ou talvez, a própria condição inflamatória materna também induz uma resposta inflamatória placentária. Estudos têm mostrado que a hiperglicemia, o principal desencadeador da diabetes, ativa uma plethora de alterações metabólicas e hemodinâmicas responsáveis pelas complicações dessas doenças como a nefropatia, retinopatia, entre outras (BERNSTEIN et al., 2002). Dentre as consequências diretas dessas alterações estão a produção de citocinas inflamatórias, de espécies reativas de oxigênio e de fatores de crescimento e indutores de morte celular (AKERFELDT et al., 2008). Estudo anterior observou uma correlação positiva entre os níveis placentários de IL-10 e marcadores de prognóstico perinatal como Apgar. Por outro lado, correlação negativa foi observada entre a produção placentária de TNF- α e o peso do recém-nascido (MORELI et al., 2012). Neste contexto, nossos resultados sugerem que essas alterações podem também estar ocorrendo no compartimento placentário fetal e por consequência, podem afetar o desenvolvimento metabólico fetal, inclusive na hiperglicemia leve, muitas vezes clinicamente negligenciada.

Em respostas inflamatórias, a citocina IL-1 β assume um papel fundamental, envolvendo-se na cascata de sinalização que culminará na transcrição do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e sua sucessiva translocação para o núcleo, o que induz a transcrição de outros genes pró-inflamatórios, como a IL-6, iNOS e COX-2 (OSBORN et al., 2008). Ehses et al., 2008 mostraram também, que o tratamento com antagonistas de IL-1 β em ratos diabéticos reduz a hiperglicemia e a inflamação tecidual e a expressão de outras moléculas inflamatórias, como a IL-6, MCP-1 e TNF α .

A IL-6 exacerba a resistência à insulina inerente à gestação e promovida pelos hormônios placentários e, desta forma, participa da patogênese de DM2 e DMG (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Mulheres com DMG têm um aumento significativo de concentrações de IL-6 durante e após a gestação, comparadas com o grupo controle não diabético (ATEGBO et al., 2006; MELLER et al., 2006; MORISSET et al., 2011) e, níveis elevados de IL-6 estão associados com DM2 (MONTAGUE et al., 1998; PADHAN et al., 2001; YESSOUFOU et al., 2011).

A análise do biomarcador inflamatório MCP-1, também associado ao diabetes (NIU; KOLLATUKUDY, 2009) no soro e na placenta mostrou uma relação

semelhante àquela observada para IL-1 β e IL-6, no que diz respeito ao grupo de HGL. Klein et al., (2008) também observaram aumento na concentração de MCP-1 no soro de gestantes portadoras de DMG em relação ao grupo controle não diabético, corroborando nossos resultados. *In vitro*, MCP-1 recruta monócitos e induz a expressão de moléculas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e iNOS. Neste contexto, a elevada produção de MCP-1 nos vilos coriônicos das placentas de gestantes portadoras de HGL, DMG e DM2, deve também estar relacionada à produção das demais citocinas inflamatórias.

Também constatamos a expressão aumentada da enzima iNOS nos vilos coriônicos dos grupos de gestantes acometidas por distúrbios glicêmicos. Além disso, observamos alterações na distribuição desses marcadores nos vilos coriônicos; a reatividade presente exclusivamente no sinciotrofoblasto nas gestantes saudáveis, nas gestantes hiperglicêmicas, passou a predominar no mesênquima viloso, em diferentes tipos celulares, inclusive em células morfológicamente semelhantes aos macrófagos fetais, as células de Hofbauer (CD68+). A atividade de iNOS e a produção de NO estão associadas com a ativação de macrófagos e à produção de citocinas inflamatórias (NAGAMATU; SCHUST, 2010), o que sugere um comportamento semelhante por parte das células de Hofbauer. Estudos prévios já haviam descrito o aumento da expressão gênica e proteica de iNOS em placentas de gestantes saudáveis e portadoras de DMG (MYATT et al., 2010; SCHUNFELDER et al., 2006). Também em relação à iNOS, nosso estudo enfatizou a participação de desvios não diabetogênicos do metabolismo da glicose (grupo hiperglicêmico leve) no aumento da expressão da enzima iNOS nas células do mesênquima viloso.

Em suma, inúmeros trabalhos mostraram previamente o aumento de citocinas e fatores inflamatórios, como agentes de risco para as patologias associadas ao diabetes (DM2 e DMG). Em nosso estudo, confirmamos a partir de marcadores clássicos (IL-1 β , IL-6, iNOS, MCP-1, PCR) o perfil inflamatório materno nessas patologias, estendendo também às gestantes com hiperglicemia leve e caracterizamos a resposta inflamatória também nos vilos coriônicos, o compartimento fetal da placenta. Como esses fatores sinalizam na placenta, se por meio de estresse oxidativo ou levando a morte celular, necessita ser ainda

devidamente estudado. Entretanto, vale ressaltar que estudos prévios mostraram que na condição hiperglicêmica, as taxas de morte celular por apoptose nos vilos coriônicos estão aumentadas (SGARBOSA et al., 2006), o que sugere uma ação dessas citocinas, à semelhança do que ocorre em outros órgãos durante o estabelecimento da diabetes.

5.3 A via do inflamassoma no compartimento fetal da placenta

5.3.1 A reatividade a TLR2 e TLR4 está alterada no compartimento viloso das placentas de gestantes hiperglicêmicas

A análise das citocinas e marcadores da inflamação realizados neste estudo confirmaram que há modificação do perfil inflamatório nas vilosidades coriônicas das gestantes com distúrbios hiperglicêmicos. Embora a inflamação seja um mecanismo de defesa para ativar a imunidade e controlar a injúria, também pode levar a consequências indesejáveis dependendo do estímulo, da intensidade e duração da resposta e das condições orgânicas em geral e do próprio sistema imunológico. No desequilíbrio, ocorre a doença ou o agravamento de uma condição pré-existente.

Neste contexto, este estudo analisou a expressão de componentes do inflamassoma, a principal via de produção de citocinas pró-inflamatórias, sob o estímulo hiperglicêmico.

Embora interações diretas entre glicose e receptores semelhantes a *Toll*, capazes de reconhecer e sinalizar uma resposta via inflamassoma na presença de sinais endógenos de perigo, não tenham sido ainda descritas, níveis elevados de glicose são capazes de estimular TLR2 e TLR4 (SHI et al., 2006). Ensaios experimentais também mostraram que camundongos com DM1 e TLR4 silenciado não acumulam lipídios na região cardíaca, não apresentam apoptose miocárdica induzida pela hiperglicemia, nem remodelamento ventricular e disfunção (DONG et al., 2012). Além disso, análises genéticas têm mostrado uma relação direta entre polimorfismos de TLR4 e a prevalência de diabetes (BAGAROLLI et al., 2004, 2010). Desta forma esse estudo analisou a expressão destes receptores em nossos grupos experimentais.

Nossos resultados mostraram que estes receptores de superfície (TLR2 e TLR4) estão presentes no sincitiotrofoblasto na gestação não associada à

hiperglicemia e que, nos grupos hiperglicêmicos, estão presentes nas células estromais dos vilos coriônicos. Ainda, observamos que o número de macrófagos fetais aumenta nestes grupos e que muitas das células TLR-reativas apresentam características morfológicas compatíveis com as destes macrófagos fetais.

Nossos resultados sobre a expressão placentária de TLR2 e TLR4 em gestações normais corroboram estudos prévios (ABRAHAMS et al., 2004; KRIKUN et al., 2007). Estes estudos mostram variações na expressão dos TLRs pelo sinciciotrofoblasto de acordo com a fase de desenvolvimento placentário. TLR2 reconhece lipoproteínas bacterianas, enquanto TLR4 reconhece LPS de bactérias gram-negativas (NGUYEN et al., 2007), sugerindo um papel de relevância para estes receptores no sinciciotrofoblasto, tornando-o competente para ativar mecanismos de defesa contra patógenos microbianos. Estudos experimentais utilizando explantes de vilos coriônicos também mostraram que TLR2 e TLR4 estimulam cascatas de sinalização que culminam com a produção de IL6, IL-8 e MCP-1 (SCHAEFER et al., 2004). Desta forma, é plausível que a reatividade aos anticorpos anti-TLRs nas placentas de gestação saudável nesse estudo reflita suas funções homeostáticas na interface materno-fetal (KOGA et al., 2009), enquanto que o deslocamento destes receptores para a população de células estromais pode estar relacionado com as condições patológicas dos grupos estudados.

A ativação de TLR2 e 4 tem sido relacionada em tecidos-alvo à resistência à insulina em indivíduos acometidos por DM2 (RAJAMANI; JIALAL, 2014) e à produção de citocinas, contribuindo para a inflamação sistêmica nestes pacientes sinalizando via inflamassoma (TSAN; GAO, 2004; WARDILL et al., 2015). O papel dos macrófagos neste circuito tem sido bastante relevante.

Macrófagos fetais são células residentes do estroma viloso e estão aumentados nas gestações hiperglicêmicas, tornando-os bons candidatos para a expressão e ativação dos TLRs para o desempenho de funções pró-inflamatórias. A presença de células reativas aos TLR2/4 apenas nas condições patológicas sugere que houve ativação dessa expressão em função de fatores associados direta ou indiretamente à hiperglicemia.

O papel dos TLRs no estabelecimento de um perfil pró-inflamatório encontrado na hiperglicemia foi demonstrado experimentalmente em ratos TLR4-/-.

Estes experimentos mostraram que ratos diabéticos TLR4^{-/-} não apresentam atividade de NF-kB, tampouco liberam citocinas pró-inflamatórias (LEE et al., 2013). Para avaliar se esses receptores poderiam estar funcionalmente ativos foi então estimada a ativação do fator NF-kB.

5.3.2 A atividade de NF-kB

O fator de transcrição NF-kB é um dímero formado, principalmente, pelas proteínas p65 e p50 que estão presentes no citoplasma ligadas a uma proteína inibidora, IκB. Vários compostos têm a capacidade de ativar esta via, fosforilando IκB para desencadear sua degradação. Isto permite a translocação de NF-kB para o núcleo, culminando em transcrição e tradução de proteínas pró-inflamatórias (DUNNE, 2011). O NF-kB é, desta forma, um regulador chave do processo inflamatório, para a imunidade inata e adaptativa.

Em nosso estudo, observamos um aumento na translocação de NF-kB para as regiões nucleares nos grupos hiperglicêmicos HGL, DMG e DM2, indicando sua ativação. Associado ao aumento na expressão de TLRs e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias nestes grupos, estes achados reforçam a possibilidade de participação da hiperglicemia no estabelecimento de uma condição pró-inflamatória também nos vilos coriônicos.

Estes achados são corroborados por estudos prévios que mostraram que o aumento da resistência à insulina em células mononucleares de sangue periférico em pacientes com DM2 está associado a alterações na expressão gênica de TLRs, envolvidos na ativação de NF-kB (KUZMICKI et al., 2013; LIM; TANG et al., 2013). Além disso, outros estudos também sugerem que a expressão e ativação dos TLRs, de NF-kB e a transcrição de citocinas inflamatórias estão intimamente associadas a uma plataforma molecular, um complexo denominado inflamassoma (CREAGH & O'NEILL, 2006). Neste contexto, tornou-se crucial analisar também os componentes da via do inflamassoma, que pode ser sinalizada por sinais endógenos de perigo por meio de receptores semelhantes a Toll e receptores NOD, assim como seu produto final para ativação de pró-citocinas, a caspase 1.

5.3.3 O aumento de expressão de NLRP1/3, ASC e de Caspase 1 clivada sugere que inflamassomas são ativados nos quadros hiperglicêmicos

Ao longo dos últimos 10 anos, os inflamassomas foram reconhecidos por seus papéis na defesa do hospedeiro contra patógenos invasores e, também, por participarem do desenvolvimento do câncer, doenças inflamatórias, metabólicas e neurodegenerativas (GUO et al., 2015). A montagem de um complexo inflamassoma requer sensoriamento citosólico de padrões moleculares associados a patógenos ou padrões moleculares associados a danos por um domínio de repetições ricos em leucinas em um receptor de ligação de nucleotídeos de repetição (NLR) ou receptores ausentes em melanoma 2 (AIM2) - como receptores (ALR). NLRs e ALRs envolvem a caspase-1, na maioria dos casos que requerem a proteína adaptadora (ASC) para catalisar a clivagem proteolítica da pró-interleucina-1 β (pro-IL-1 β) e pró-IL-18. Estudos recentes indicam que as quinases da caspase-8, caspase-11 e IL-1R-associadas (IRAK) também contribuem para a função dos inflamassomas.

Embora tenham sido descritos inúmeros inflamassomas, neste estudo, foram analisadas apenas a expressão proteica de NLRP1 e NLRP3 com relevante papel na resistência à insulina e metabolismo da glicose (TANG, 2013; VANDANMAGSCAR et al., 2011). O papel desempenhado pelos componentes NLRP3, ASC e Caspase 1 do inflamassoma, na indução da inflamação metabólica e da resistência à insulina foi enfatizado em camundongos geneticamente modificados, em que essas moléculas estavam ausentes.

Os componentes NLRP1 e 3 mostraram aumento de expressão em todos os grupos hiperglicêmicos, enquanto que a molécula adaptadora ASC só se mostrou aumentada nos grupos diabéticos DM2 e DMG. Caspase 1 ativada também se mostrou aumentada nos grupos hiperglicêmicos. Estes achados sugerem uma relevante mudança de comportamento na presença de hiperglicemia, que possivelmente agindo como estímulo direto ou indireto, ativa funções de defesa no mesênquima placentário. Por outro lado enfatiza a presença de inflamação placentária em gestações cujas mães possuem distúrbios glicêmicos, mesmo quando a hiperglicemia materna não é suficientemente alta para se caracterizar DM (no caso de HGL).

A expressão de componentes do inflamassoma já havia sido descrita na placenta humana, no entanto não pelos componentes estromais dos vilos coriônicos, mas pelo trofoblasto (MULLA et al., 2011). Em ensaios in vitro, esse estudo utilizou

como estímulo o ácido úrico e mostrou o aumento de expressão e ativação dos componentes da via do inflamassoma (NLRP1, NLRP3, ASC e caspase-1) e a secreção de IL-1 β (MULLA et al., 2011). É possível que diferentes estímulos atuem sobre diferentes populações celulares, ou ainda que as diferentes populações celulares exibam sensibilidade diferencial em relação aos variados estímulos a que um tecido pode estar sujeito.

Os mecanismos de ação do NLRP1 ainda são obscuros. Sua expressão foi previamente relatada em placentas humanas (ZHANG et al., 2008). Aparentemente, sua ativação está associada à interação dos PRRs por vírus, como o antrax, ou em doenças classificadas como autoimunes, como o DM1. TANG, em 2013, estudou dez genes associados à fisiopatologia do DM1, constatando a associação do gene *NLRP1* ao DM1. Além disso, estudos genéticos mostram que mutações em NLRP1 assim como em NLRP3, NLRC4 ou AIM2 correlaciona-se com o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a enterocolite, o câncer e o *diabetes* (MAN; KANNEGANTI, 2015). Neste contexto, a expressão de NLRP1 nas placentas de gestantes hiperglicêmicas sugere um novo caminho a ser estudado e nos faz refletir sobre a função de NLRP1 em células trofoblásticas e mesenquimais em doenças metabólicas.

NLRP3 é um fator chave na ativação de células-T e macrófagos e está associado a perturbações da sensibilidade à insulina e inflamação metabólica (LEE et al., 2013). É ativado por sinais endógenos, possivelmente por moléculas que são liberadas quando há aumento dos níveis de glicose (OZAKI et al., 2015). Lee et al. (2013) observaram importante aumento da expressão gênica e proteica de NLRP3, ASC, caspase-1 e citocinas pró-inflamatórias em culturas de macrófagos derivados de monócitos de pacientes com DM2. Em camundongos, a inibição do gene de *NLRP3* melhorou a sensibilidade à insulina e a homeostase da glicose (VANDANMAGSAR et al., 2011). Neste contexto nossos achados corroboram estes e outros estudos prévios e acrescenta a capacidade de resposta do mesênquima placentário às alterações do meio materno hiperglicêmico, no que diz respeito aos componentes do inflamassoma.

A proteína ASC representa uma das únicas proteínas codificadas no genoma humano que contém um domínio de recrutamento de caspases; a presença de ASC

em culturas celulares aumenta a concentração de IL-1 β em seu sobrenadante (STEHLIK et al., 2003). Há uma complexa interação de ASC com proteínas como TLR e TNF α na ativação da pró-caspase-1, liberação de citocinas e controle das respostas inflamatórias. Aumento da expressão gênica de ASC e de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β é também observada em indivíduos diagnosticados com DM2 (LEE et al., 2013).

Em nosso estudo, não se observou aumento de expressão da molécula adaptadora ASC nas gestações com HGL, apenas nas gestações dos grupos DM2 e DMG. Segundo nossos achados e outros da literatura (MORELI et al., 2015), a expressão e produção de citocinas em placentas de gestantes com HGL é menor em relação às diabetes clássicas DM2 e DMG, o que pode estar relacionado a uma menor expressão de ASC nesses casos. No entanto, este achado pode estar associado a significados funcionais mais específicos, o que necessita ser melhor investigado em um futuro próximo.

A expressão proteica da caspase-1 clivada em suas duas subunidades ativas mostrou-se aumentada em placentas de gestantes hiperglicêmicas (HGL, DMG e DM2). A caspase-1 participa da resposta inflamatória clivando os precursores da IL-1 β , IL-18 e IL-33 para uma forma madura e ativa, capaz de ser segregada da célula (FINUCAME et al., 2015). Em tecido adiposo de mulheres portadoras de DMG, LAPPAS, 2014 observou que a expressão e clivagem de caspase-1 se correlacionavam positivamente com a secreção de IL-1 β . Esta ativação é rigorosamente controlada, sendo um mecanismo fundamental para a inflamação (LAPPAS, 2014).

A citocina IL-1 β produzida após a ativação do inflamassoma induz a expressão de fatores pró-inflamatórios, como a citocina IL-6, contribuindo para a inflamação tecidual, disfunção e morte de células (LUO et al., 2003). Processos inflamatórios semelhantes também são observados em pacientes com DM2 (MAEDLER et al., 2009). Nossos resultados também sugerem um comportamento similar nos tecidos placentários de indivíduos hiperglicêmicos, que apresentam níveis elevados de fatores pró-inflamatórios (NUNEMAKER et al., 2013). Como em outros tecidos, o significado geral destes resultados em placenta pode ser interpretado como uma capacidade para regular as respostas imunológicas celulares e proteger a interface

materno-fetal no nível molecular, através de um delicado equilíbrio entre a ativação e inibição de inflamação para permitir a remoção de elementos sem prejudicar a funcionalidade do tecido.

Gestantes com disfunções hiperglicêmicas podem apresentar patologias associadas. Obesidade, nefropatia, vasculopatias clínicas e subclínicas, por exemplo, podem exacerbar quadros inflamatórios tornando difícil estabelecer relações diretas da hiperglicemia e suas consequências. Neste contexto, realizamos adicionalmente ensaios *in vitro*, utilizando explantes de vilos coriônicos de gestantes saudáveis tratados com diferentes concentrações de glicose. Nossos resultados mostraram uma relação entre o aumento da concentração de glicose e a expressão proteica dos componentes da via do inflamassoma (NLRP1, NLRP3 e ASC), ressaltando o papel da hiperglicemia, não associada a outros fatores de risco.

Em suma, este estudo mostrou que a hiperglicemia materna, independente do grau da doença associada, de longa data - como no caso da diabetes tipo 2, geralmente temporária - como no caso da diabetes gestacional ou ainda de discretas proporções - como no caso da hiperglicemia leve, se reflete também na porção fetal da placenta. Nestas condições, os vilos coriônicos contatados com o sangue materno respondem com a produção de citocinas inflamatórias, principalmente por meio de suas células estromais, que incluem também a população macrofágica, as células de Hofbauer. Células deste compartimento placentário aumentam a expressão dos receptores do tipo Toll 2 e 4 e a translocação do NF- κ B, indicando sua ativação, o que pode explicar o aumento das citocinas inflamatórias encontradas nas gestações hiperglicêmicas. O aumento da expressão proteica de componentes da via do inflamassoma – NLRP1/3, ASC e Caspase 1 ativada corroboram a participação dessa via na resposta e produção de citocinas inflamatórias ativas pelos vilos placentários. Experimentos *in vitro*, confirmaram a relação entre aumento das concentrações de glicose e o aumento da expressão de componentes do sistema inflamassoma. Estes achados enfatizam a resposta placentária em função das alterações do ambiente materno e alertam para a possibilidade de lesões placentárias metabólicas ou moleculares que podem comprometer a formação e crescimento fetal, ou ainda sua vida pós-natal (aumentando o risco para o

desenvolvimento de doenças metabólicas), devido ao aumento de citocinas inflamatórias, mesmo quando a hiperglicemia gestacional é de menor intensidade.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- a. Gestantes hiperglicêmicas apresentam concentrações séricas elevadas de IL-6, IL-1 β , iNOS e MCP-1, caracterizando uma inflamação sistêmica.
- b. Em vilosidades coriônicas das placentas de gestantes hiperglicêmicas, há aumento da concentração de IL-6, IL-1 β , iNOS e MCP-1, indicando um processo inflamatório também nestes vilos.
- c. Na região vilosa de placentas de mães hiperglicêmicas, além da maior expressão de iNOS e MCP-1, há predomínio de reatividade em células semelhantes a macrófagos fetais, sugerindo um papel inflamatório destas células na presença de um ambiente hiperglicêmico.
- d. Há aumento da expressão tecidual de TLR2 e TLR4 no compartimento fetal placentário de gestantes hiperglicêmicas, inclusive em células morfológicamente semelhantes a macrófagos fetais.
- e. Em placentas de gestantes hiperglicêmicas, há maior translocação de NF- κ B para o núcleo, indicando sua ativação nestas gestantes.
- f. A expressão proteica dos componentes dos inflamassomas NLRP1, NLRP3 e ASC eleva-se na presença de hiperglicemia.
- g. Aumento na concentração de Caspase-1 clivada indica atividade na maturação das interleucinas produzidas na porção vilosa da placenta.
- h. O aumento nas concentrações de citocinas inflamatórias, associado às expressões protéicas de TLR2/4, NLRP1/3 e ASC e, a presença de caspase 1 clivada indica que a via do inflamassoma NLRP1 e 3 está associada à produção de citocinas inflamatórias no compartimento viloso e fetal da placenta.
- i. *In vitro*, as vilosidades coriônicas respondem a hiperglicemia aumentando a expressão de moléculas participantes da via dos inflamassomas NLRP1, NLRP3 e ASC, indicando uma participação direta da glicemia na ativação da via do inflamassoma.

REFERÊNCIAS*

ABRAHAMMS, V. M. et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. **Journal Immunology**, v. 173, n. 7, p. 4286-4296, 2004.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nature Immunology**, v. 4, p. 499-511, 2004.

AKERFELDT, M. C. et al. Cytokine-Induced β -Cell Death Is Independent of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling. **Diabetes**, v. 57, p. 334-344, 2008.

ATEGBO, J. M. et al. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4137–4143, 2006.

American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. n. 33, p. 33S62-S69, 2015. Disponível em: <http://care.diabetesjournals.org/content/33/Supplement_1/S62.full.pdf+html>. Acesso em: 10 jan, 2015.

American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabete mellitus. **Diabetes Care**. n. 33, p. S62-S69, 2010. Disponível em: <http://care.diabetesjournals.org/content/33/Supplement_1/S62.full.pdf+html>. Acesso em 10 jan 2015.

ACOG Committee on Practice Bulletins—Obstetrics. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. **Obstetric Gynecology**, v. 99, n. 33, p. 159-167, 2002.

BAYLIS, S. A. et al. Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta. **Molecular Human Reproduction**, v. 5 p. 277-286, 1999.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P.; BAERGEN , R. Microscopic Survey. In - **Pathology of human placenta**. 5. ed. Local: New York. Springer, 2006. p. 16-24.

BOYD, J. D.; HAMILTON, W. J. **The human placenta**. Cambrige: W Heffer & Sons, 1970, 326 p.

BURTON, G. J. et al. A reappraisal of the contrasting morphological appearances of villous cytotrophoblast cells during early human pregnancy; evidence for both apoptosis and primary necrosis. **Placenta**, v. 24, p. 297–305, 2003.

BERTHA, L. et al. C-Reactive Protein and Preterm Delivery: Clues From Placental Findings and Maternal Weight. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 6, p. 715-2012.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informações e documentação: referências: elaboração. Rio de janeiro, 2002.

BO, S. et al. C-reactive protein and tumor necrosis factor-alpha in gestational hyperglycemia. **Journal Endocrinology Investigation**, v. 28, n. 9, p. 779-782, 2005.

BERNSTEIN, R. R.; BUSIK, J. V; HENRY, D. N. Are diabetic neuropathy, retinopathy and nephropathy caused by hyperglycemic exclusion of dehydroascorbate uptake by glucose transporters? **Journal Theory Biology**, v. 7, n. 216, p. 345-359, 2002.

BUHANAN, M. D. et al. What is Gestational Diabetes? **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p. S105-S111, 2007.

BAGAROLLI, R. A.; SAAD, M. J.; SAAD, S. T. O. Toll-like receptor 4 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms are associated with Type 2 diabetes. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 24, n. 3, p. 192-198, 2010.

CABRAL et al. Concentração Sérica Materna da Proteína C Reativa em Gestações Complicadas pela Pré-eclâmpsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n.1, 2002.

CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T. M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis molecular recognition. **Placenta**, v. 25, p. 103–113, 2004.

CREAGH, E.M.; O'NEILL, L.A. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. **Trends Immunology**, v. 8, p. 352-357, 2006.

CHEN, C.Y.; CHEN, C.P.; LIN, K.H. Biological Functions of Thyroid Hormone in Placenta. **International Journal of molecular science**, v. 16, n. 2, p. 4161-4179, 2015.

CHIANG, C.Y. **The role of reactive oxygen species and calcium in the interferon regulatory factor 3 mediated toll like receptor 4 signaling**. 2007. 92 p. Ph D. thesis, San Diego: University of California, 2007.

CASTELLUCCI, M. et al. The development of the human placental villous tree. **Anatomy and Embryology**, v. 181, p. 117–128, 1990.

CALDERON, I. M. P. et al. Diabetes and pregnancy: an update of the problem. **Asia Reproductive Biotechnology Society**, v. 9 p. 1–11, 2007.

CALDERON, I. M. P. **Estudo morfométrico de vilosidades placentárias relacionado a níveis glicêmicos e dopplervelocimetria da artéria umbilical em gestações complicadas por hiperglicemia diária e diabete gestacional e clínico**. 2003. Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

CALDERON, I. M. P.; CECATTI, J. G.; VEGA, C. E. P. Intervenções benéficas no pré-natal para prevenção da mortalidade materna. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n.5, p. 310-315, 2006.

CONSIDINE, R. V. et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 292-295, 1996.

CHAVES, E. G. S. et al. Estudo retrospectivo das implicações maternas, fetais e perinatais em mulheres portadoras de diabetes, em 20 anos de acompanhamento no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 7, 2010.

DONG, B. et al. TLR4 regulates cardiac lipid accumulation and diabetic heart disease in the nonobese diabetic mouse model of type 1 diabetes. **American Journal Heart and Circulatory Physiology**, v. 15, n. 6, p H342-H372, 2012.

DE LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. **Federation of European Biochemical Societies, Letter**, v. 582 p. 97–105, 2008.

DENISON, C.; FIONA, W.; KELLY, R; CALDERA, A.; RILEY, S. Cytokine secretion by human fetal membranes, deciduas and placenta at term. **Human Reproduction**, v. 13 p. 3560-3565, 1998.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). p.1-390, 2014-2015. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/images/2015/area-restrita/diretrizes-sbd-2015.pdf>> Acesso em : 10 jan, 2015.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, p. 313-326, 2009.

DASU, M. R. et al. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. **Diabetes Care**, v. 33, n. 4, p. 861-868, 2010.

DUNNE, A. Inflammasome activation: from inflammatory disease to infection. **Biochemical Society Transactions**, v.39, p. 669–673. 2011.

DEL NERO, U. et al. Metodologia para estudo do volume e densidade absoluta da placenta humana a termo. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, p. 669-673, 2002.

DZIARSKI, R.; GUPTA, D. Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes. **Journal of Endotoxin Research**, v. 6, n. 5, p. 401-405, 2000.

DEMPSEY, E. W. The development of capillaries in the villi of early human placentas. **American Journal of Anatomy**, v. 134, p. 221–238, 1972.

DEMIR, R. et al. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. **Acta Anatomica Journal**, v. 136, p. 190–203, 1989.

DEMIR, R. et al. Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, p. 29-41, 1997.

EBERSOLE, J. L. et al. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. **Journal of Periodontology Online**, v. 62, n. 1, p. 163-202. 2013.

DENG, et al. Recent advances in the role of toll-like receptors and TLR agonists in immunotherapy for human glioma. **Protein Cell**, v. 5, n. 12, p. 899-891, 2014.

ENDERS, A. C.; KING, B. F. The cytology of Hofbauer cells. **The Anatomical Record**, v. 167, p. 231–252, 1970.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 1590-1604, 2007.

FOX, H.; BLANCO, A. A. Scanning electron microscopy of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 4, p. 45–50, 1974.

FETITA, L. S. et al. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, p. 3714-3724, 2006.

FUJIMOTO, M. et al. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. **Diabetes**, v. 54, p.1340-1348, 2005.

FINUCANE, O. M. et al. Monounsaturated fatty acid enriched high fatdiets impede adipose NLRP3 inflammasome mediated IL1 β secretion and insulin resistance despite obesity. **Diabetes**, 2015.

FAYYAZ, S. et al. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1319, n. 1, p. 82-95, 2014.

GAUSTER, M. et al. The placenta and gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes and Pregnancy**, v. 10, p. 244-245, 2011.

GUO, H. et al. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **nature medicina**, p 1-11, 2015.

GRAF, R. et al. The extravascular contractile system in the human placenta. Morphological and immunocytochemical investigation. **Anatomy and Embryology**, v. 190, p. 541–548, 1994.

GRAF, R. et al. Molecular anatomy of the perivascular sheath in human placental stem villi: the contractile apparatus and its association to the extracellular matrix. **Cell Tissue Research**, v. 290, p. 601–607, 1997.

GUIBOURDENCHE, J. et al. Development and hormonal functions of the human placenta. **Folia Histochemical Cytobiology**, v. 47, n. 5, p. S35-S40, 2009.

HOSHINA, M. et al. Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental-lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. **Placenta**, v. 6, p.163–172, 1985.

HUPPERTZ, B. The anatomy of the normal placenta. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 12, p.1296-1302, 2008.

HUPPERTZ, B. et al. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. **Laboratory Investigation**, v. 79, p.1687–1702, 1999.

INNES, K. E.; WIMSATT, J. H. Pregnancy-induced hypertension and insulin resistance: evidence for a connection. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 78, p. 263-284, 1999.

INGMAN, K. et al. Characterization of Hofbauer cells in first and second trimester placenta: incidence, phenotype, survival in vitro and motility. **Placenta**, v. 31, p. 535–544, 2001.

JONES, C. J. P.; FOX, H. Ultrastructure of the normal human placenta. **Electron Microscopy Reviews**, v. 4, p.129–178, 1991.

KAHN, B. B. ; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v.106, p. 473-481, 2000.

KLEIN, K. et al. Circulating Levels of MCP-1 are increased in women with gestational diabetes. **Prenatal Diagnosis**, V. 28, p. 845–851, 2008.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetes Care**, v. 25, p. 1862-1868, 2002.

KHAN, S. et al. Human villous macrophage conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1075–1083, 2000.

KAHN, S. E. et al. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **NATURE**, v. 4, p. 14-44, 2006.

KRAUSE, B. J.; HANSON, M. A; CASANELLO, P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. **Placenta**, v. 32, p. 797-805, 2011.

KAKUI, K. et al. Expression of Nitric Oxide Synthase. Isoforms in the Human Placenta Is not Altered by Labor. **Endocrine Journal**, v. 50, p. 535-544, 2003.

KAUFMANN, P.; SEN, D. K.; SCHWEIKHART, G. Classification of human placental villi. **Histology Cell Tissue Research**, v. 200, p. 409–423, 1979.

KOHNEN, G. et al. Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. **Histochemistry and Cell Biology**, v.101, p. 415–429, 1996.

KAUFMANN, P.; NAGL, W.; FUHRMANN, B. Die funktionelle Bedeutung der Langhanszellen der menschlichen. **Placenta**, v. 77, p. 435–436, 1983.

KUZEMTSEVA, L. et al. Regulation of toll-like receptors 3, 7 and 9 in porcine alveolar macrophages by different genotype 1 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.15, n.158, p.189-198, 2014.

KAUFMANN, P.; STARK, J. Enzyme-histochemical studies on mature human placental villi. I. Differentiation and degeneration of the trophoblast. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 29, p. 65–82, 1972.

KOGA, K.; ALDO, P. B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 35, n. 2, p. 191-202, 2009.

KUZMICKI, M. et al. The expression of genes involved in NF-κB activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with gestational diabetes. **European Journal of Endocrinology**, v. 20, n. 3, p. 419-427, 2013.

KASZNICA, J. M.; PETCU, E. B. Placental calcium pump: clinical-based evidence. **Fetal & Pediatric Pathology**, v. 22, p. 223– 227, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-κB by Toll-like receptors. **Trends of Molecular Medicine**, v. 13, n. 11, p. 460-469, 2007.

KUZMICKI, M. et al. Circulating pro- and anti-inflammatory cytokines in Polish women with gestational diabetes. **Hormone and Metabolic Research**, v. 40, p. 556-560, 2008.

KOHNEN, G. et al. The monoclonal antibody GB42-a useful marker for the differentiation of myofibroblasts. **Cell Tissue Research**, v. 281, p. 231–242, 1995.

KONDI-PAFITI, A. et al. Immunohistochemical study of inhibin A and B expression in placentas from normal and pathological gestations. **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology**, v. 40, n.1, p.109-112, 2013.

KARLSSON, H. et al. Pattern of Cytokine Responses to Gram-Positive and Gram Negative Commensal Bacteria Is Profoundly Changed when Monocytes Differentiate into Dendritic Cells. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2671-2678, 2004.

LATZ, E; XIAO, S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature Review Immunology**, v. 13, p. 397-411, 2013.

LYALL, F. et al. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide. **American Journal of Pathology**, v. 154, n. 4, p. 1105-1114, 1999.

LOWE, L. P. et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study Associations of maternal A1C and glucose with pregnancy outcomes and for the HAPO Study Cooperative Research Group. **Diabetes Care**, v. 35, n. 3, p. 574–580, 2012.

LEE, H. M. et al. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 62, n. 1, p. 194-204, 2013.

LIMA, C. P. **A placenta da gestante diabética**. 1998. 133 f. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

LAPPAS, M. et al. Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. **Biology Reproductive**, v. 2, n. 67, p. 668-673, 2002

LIN, Z. et al. Structural Insights into TIR Domain Specificity of the Bridging Adaptor Mal in TLR4 Signaling. **PLoS. One.**, v. 7, n. 4, p. 342-02, 2012.

LIN, M.; TANG, S. C. W. Toll-like receptors: sensing and reacting to diabetic injury in the kidney. **Nephrology Dialysis Transplant**, p. 1-11, 2013.

LEE, H. M. et al. Upregulated NLRP3 Inflammasome Activation in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 62, p. 194-204, 2013.

LUO, G. et al. IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. **American Journal Physiology**, v. 284, n. 5, p. 249-254 2003.

LEE, M. S. Role of Innate Immunity in Diabetes and Metabolism: Recent Progress in the Study of Inflammasomes. **Immune Network**, v. 11, n. 2, p. 95-99, 2011.

LYALL, F. et al. Human Trophoblast Invasion and Spiral Artery Transformation- The Role of Nitric Oxide. **American Journal Pathology**, v.154, p.1105-1114, 1999.

LATKOVSKIS, G.; LICIS, N.; KALNINS, U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. **European Journal Immunogenetic**, v. 31, p. 207-213, 2004.

MULLA, M. J. et al. Uric acid induces trophoblast IL-1 β production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia. **American Journal Reproductive Immunology**, v. 65, n. 6, p. 542-548, 2011.

MEDZHITOV R; JANEWAY C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 295-297, 1997.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002.

MAN, S. M.; KANNEGANTI, T. D. Regulation of inflammasome activation. **Immunology Reviews**, v. 265, n.1, p. 6-21, 2015.

MENG, X. F. et al. Nod-like receptor protein 1 inflammasome mediates neuron injury under high glucose. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 2, p. 673-684, 2013.

MA, Y. et al. Cell Type-specific Expression and Function of Toll-like Receptors 2 and 4 in Human Placenta: Implications in Fetal Infection. **Placenta**, v. 28, n. 10, p. 1024-1031, 2007.

MAYHEW, T. M. et al. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13–41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes. **Placenta**, v. 20:407–22. 1999.

MARTINOLI, C. et al. Scanning electron microscopy of stromal cells of human placental villi throughout pregnancy. **Cell Tissue Research**, v. 235, p. 647– 655, 1984.

MORELI, B. J. et al. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. **International Scholarly Research Notices Obstetrics and Gynecology**, v.10, 2012.

MAEDLER, K. et al. Low concentration of interleukin-1 beta induces FLICE-inhibitory protein-mediated beta cell proliferation in human pancreatic islets. **Diabetes**, v. 55, p. 2713-2722, 2006.

MAEDLER, K. et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 851-860, 2002.

MACINTOSH, M.C. et al. Perinatal mortality and congenital anomalies in babies of women with type 1 or type 2 diabetes in England, Wales, and Northern Ireland: population based study. **British Medical Journal**, v. 333, p. 1–6, 2006.

MAYHEW, T. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. **Placenta**, v. 25, p.127-139, 2004.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 475-478, 2014.

METZGER, B. E. et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. The HAPO Study Cooperative Research Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1991-2002, 2008.

MORELI, J. B. et al. Changes in the TNF-alpha/IL-10 ratio in hyperglycemia-associated pregnancies. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.107 n. 3, p 362-369, 2015.

MORISSET, A.; DUBE, M.; CÔTE, J. Á. Circulating interleukin-6 concentrations during and after gestational diabetes mellitus. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 90, p. 524-530, 2011.

MYATT, L.; BROCKMAN, D. E. Inducible (type II) nitric oxide synthase in human placental villous tissue of normotensive, preeclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. **Placenta**, v. 18, p. 261–268, 1997.

MELLER, M. C. et al. Changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus. **Physiological Research**, v. 55, n. 5, p. 501–512, 2006.

MILLER, A.M. Role of IL-33 in inflammation and disease. **Journal of Inflammation (London, England)**, v. 8, p. 22-25, 2011.

MYATT, L. Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. **Placenta**, v. 31, p. 66-69, 2010.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature Reviews Nephrology**, v.7, p. 327-340, 2011.

NAKAMURA, N. et al. Endosomes are specialized platforms for bacterial sensing and NOD2 signalling. **Nature**, v. 8, n. 509, p. 240-244, 2014.

NGUYEN, M. T. et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 35279-35292, 2007.

NIU, J.; KOLLATUKUDY, E. P. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. **Clinical Science**, v.117, p. 95-109, 2009.

NAGAMATSU, T.; SCHUST, D. J. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, p. 460-471, 2010.

OZAKI, E.; CAMPBELL, M.; DOYLE, S. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. **Journal of Inflammation Research**, v. 284, n. 5, p. 249-254, 2015.

OSBORN, O. et al. Insights into the roles of the inflammatory mediators IL-1, IL-18 and PGFE2 in obesity and insulin resistance. **Swiss Medical Weekly**, v. 138, p. 665-673, 2008.

OCKLEFORD, C. D.; WAKELY, J. The skeleton of the placenta. In: HARRISON, R. J.; HOLMES, R. L. **Progress in anatomy**. 5 ed. London: Cambridge University Press, 1981, p.19–48.

OPDENBOSCH, N. V. et al. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. **Nature Communications**, v. 10, n. 1038, 2014.

PIETRO, L. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. **Placenta**, v. 31, n. 9, p. 770-780, 2010.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, p. 1805-1812, 2003.

PARIA, B. C. et al. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 3, p. 1047-1052. 2001.

PRADHAN, A. D. et al. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 286, n. 3, 2001.

PANTHAM, P. et al. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. **Placenta**, v. 36, p. 709-715, 2015.

RUDGE, M. V. et al. Translational research in gestational diabetes mellitus and mild gestational hyperglycemia: current knowledge and our experience. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 57, n. 7, p. 497-508, 2013.

RAY, J. G.; O'BRIEN, T. E.; CHAN, W. S. Preconception care and the risk of congenital anomalies in the offspring of women with diabetes mellitus: a meta-analysis. **International Journal of Medicine**, v. 94, p. 435-444, 2001.

RIZZO, T. et al. Prenatal and perinatal influences on long-term psychomotor development in offspring of diabetic mothers. **American Journal of Obstetric Gynecology**, v. 173, p.1753-1758, 1995.

RUDGE, M. V. C. **Perfil glicêmico e teste de tolerância oral a glicose no diagnóstico do diabetes na gravidez**. 1983 Tese (Livre-Docência). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1983.

RUDGE, M. V. C. et al. Hiperglicemia materna diária diagnosticada pelo perfil glicêmico: um problema de saúde pública materno e perinatal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n.11, p. 691-697, 2005.

RUDGE, M. V. et al. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. A retrospective 10-year analysis. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 50, p.108-112, 2000.

RUDGE, M. V. et al. The oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycemia during pregnancy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 23, p.107-109, 1990.

RUDGE, M. V. C. et al. Investigação diagnóstica do diabetes na gestação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 18, p. 21-26, 1996.

RAJAMANI, U.; JIALAL, I. Hyperglycemia induces Toll-like receptor-2 and -4 expression and activity in human microvascular retinal endothelial cells: implications for diabetic retinopathy. **Journal Diabetes Research**, v. 201, 2014.

ROVERE-QUERINI, P. et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. **EMBO Reports Journal**, v. 5, p. 825-830, 2004.

RETNAKARAN, R. et al. The graded relationship between glucose tolerance status in pregnancy and postpartum levels of low-density-lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in young women: implications for future cardiovascular risk. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4345-4353, 2010.

STIENSTRA, R.; TACK, C. KANNEGANTI, T. The inflammassome puts obesity in the danger zone. **Cell Metabolism**, v. 15, p. 10-18, 2012.

SGARBOSA, F. et al. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 73, p.143-149, 2006.

STEINBORN, A. et al. Elevated placental cytokine release, a process associated with preterm labor in the absence of intrauterine infection. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 88, p. 534-539, 1996.

SADLER, T. W. **Embriologia geral**. In: Langman Embriologia Médica. 9^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 2004. p 3-99.

SCHIEBLER, T. H.; KAUFMANN, P. Über die Gliederung der menschlichen Placenta. **Z Zellforsch Mikrosk Anat journal**, v.102, p. 242–265, 1969.

SCAFFIDI, P.; MISTELI T.; BIANCHI, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. **Nature**, v. 418, p. 191-195, 2002.

SCHUNFELDER, G. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of women with gestational diabetes. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, 2006.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, p. 3015–3025, 2006.

SCHAEFER, T. M. et al. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. **Immunology**, v. 112, n. 3, p. 428-436, 2004.

STEHLIK C. et al. Apoptosis- associated speck-like protein containing a Caspase Recruitment Domain is a regulator of Procaspase-1 activation. **Journal Immunology**, v. 171, p. 6154-6163, 2003.

TANG, L. et al. Genetic Associations with Diabetes: Meta-Analyses of 10 Candidate Polymorphisms. **PLOS One Journal**, v. 8, n. 7, 2013.

TING, J. P. et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity**, v. 28, p. 285-287, 2008.

TANG, Z. et al. Placental hofbauer cells and complications of pregnancy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1221, p. 103-108, 2011.

TANG, Z. et al. Isolation of hofbauer cells from human term placentas with high yield and purity. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, p. 336-348, 2011.

TELEJKO, B. et al. Circulating monocyte chemoattractant protein-1 in women with gestational diabetes. **Folia Histochemica et Cytophysiologica**, v. 45, p. 153-156, 2007.

TSUKUMO, D. M. et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, p. 1986–1998, 2007.

TSAN, M. F.; GAO, B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 514–519, 2004.

VANDANMAGSAR, B. et al. The NALP3/NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Autoinflammation and Insulin Resistance. **Journal of Inflammation Research**, v. 8, p. 15–27, 2015.

VON RANGO, U. Fetal tolerance in human pregnancy--a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunology Letters Journal**, v. 115, n. 1, p. 21-32, 2008.

VANAJA, S. K. et al. Bacterial RNA:DNA hybrids are activators of the NLRP3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 21, p. 7765-7770, 2014.

VITORATOS, N. Positive association of serum interleukin-1beta and CRH levels in women with pre-term labor. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 30, p. 35-40, 2007.

WYNN, R. M. Derivation and ultrastructure of the so-called Hofbauer cell. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 97, p. 235–248, 1967.

WARDILL, H. R. Toll-like receptor 4 signaling: A common biological mechanism of regimen-related toxicities: An emerging hypothesis for neuropathy and gastrointestinal toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 2, p. 122-128, 2015.

WICHEREK, L. et al. The characterization of the subpopulation of suppressive B7H4(+) macrophages and the subpopulation of CD25(+) CD4(+) and FOXP3(+) regulatory T-cells in decidua during the secretory cycle phase, Arias Stella reaction, and spontaneous abortion - a preliminary report. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 61, p. 303-312, 2009.

WIESER, V. Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective. Arch. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 61, n. 2, p. 119-125, 2013.

WEN, H. et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. **Nature Immunology**, v. 12, n. 5, p. 408-15, 2011.

YESSOUFOU, A.; MOUTAIROU, K. H. Maternal Diabetes in Pregnancy: Early and Long-Term Outcomes on the Offspring and the Concept of “Metabolic Memory” **Experimental Diabetes Research**, 2011.

ZHANG, P. et al. Expression Analysis of the NLRP Gene Family Suggests a Role in Human Preimplantation Development. **Nature Immunology**, v. 3, n. 7, p. 1-8, 2008.

ZAREMBER, K. A.; GODOWSKI, P. J. Cytokines Response to Microbes, Their Products, and Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Receptors and Differential Regulation of Tissue Expression of Human Toll-Like. **Journal immunology**, v. 10, 2002.

ZITVOGEL, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. **Cell**, v.140, p. 798-804, 2010.