

ALINE PAIXÃO ALENCAR

**PERFIL INFLAMATÓRIO EM GESTAÇÕES COM DISTURBIOS
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

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.

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 sinciciotrofoblasto, 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 sinciciotrofoblasto torna-se bastante aumentado; este aumento é seguido pela proliferação das células do citotrofoblasto que, ao empurrar o sinciciotrofoblasto 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 sinciciotrofoblasto 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 sinciciotrofoblasto 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

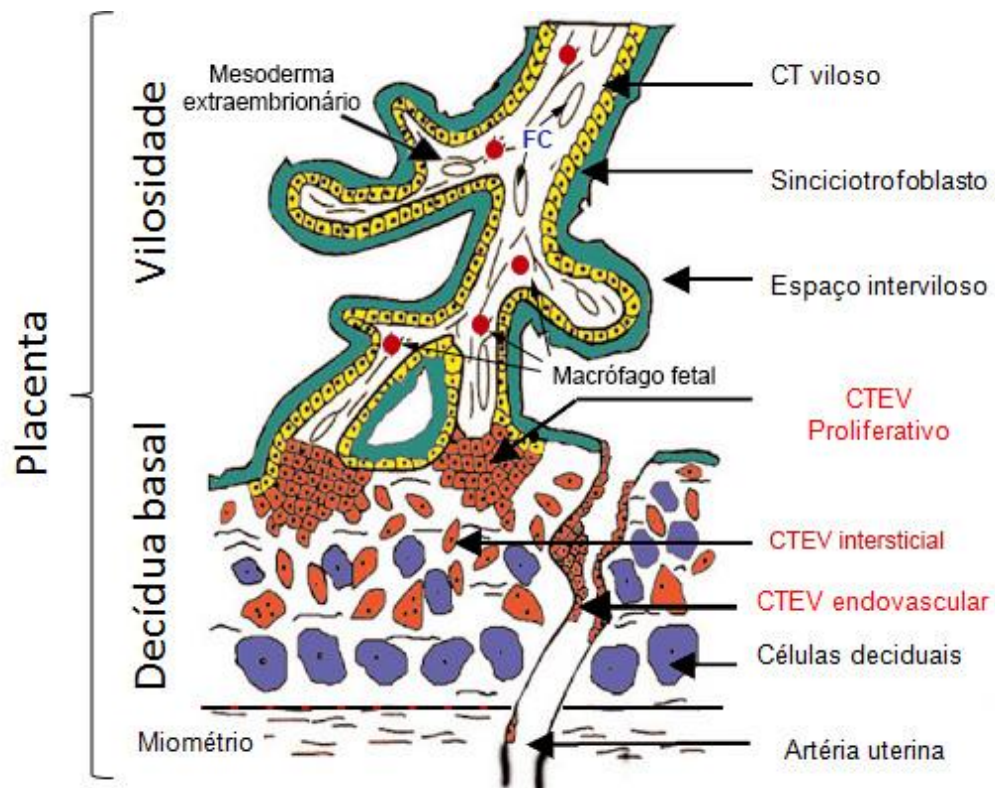
artérias espiraladas uterinas, transformando essas artérias em vasos de baixa resistência (PARIA et al., 2001). Células citotrofoblásticas extravilosas intersticiais invadem a decídua e interagem com diferentes populações de células maternas, desempenhando funções importantes na imunoregulação da gestação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

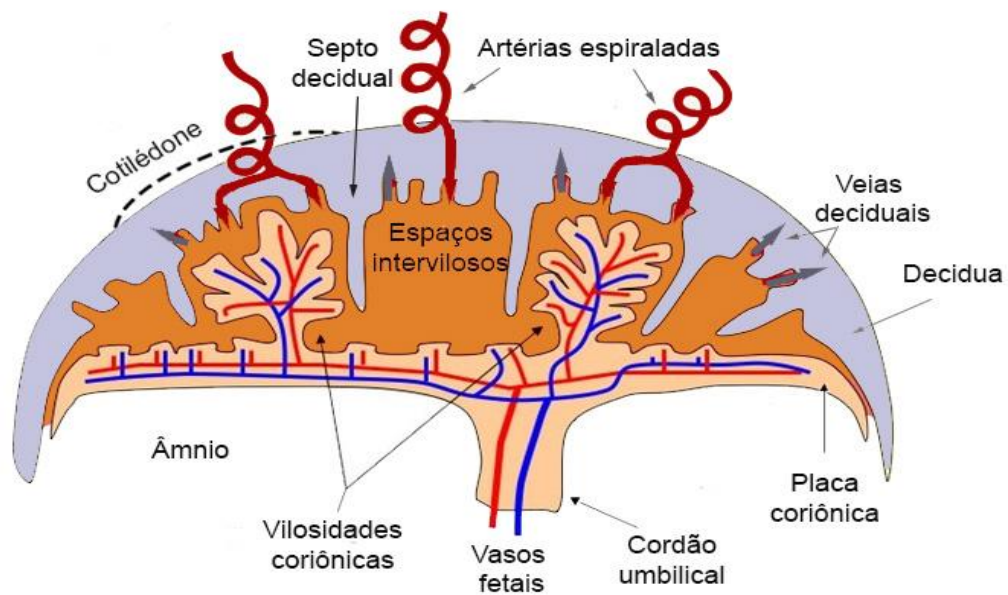


O esquema mostra o ápice de uma vilosidade coriônica humana, onde está representado o sinciciotrofoblasto, as células o citotrofoblasto viloso, o mesoderma extraembrionário com macrófagos e vasos fetais (FC). No ápice da vilosidade notar o crescimento de células citotrofoblásticas (CTEV) em direção à 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 sinciciotrofoblasto no início da gestação e, a partir da 12^a 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.

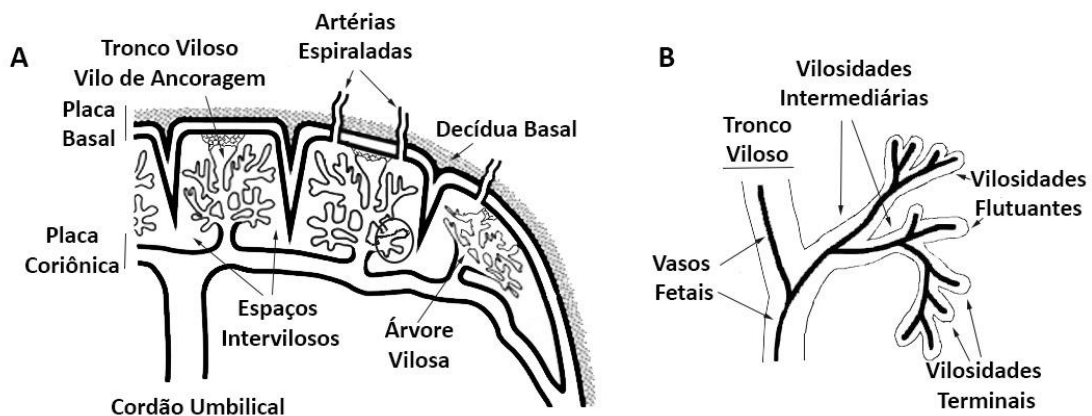
1.2.1 Vilosidades coriônicas

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 sinciciotrofoblasto 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 intervilosos. 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 intervilosos. 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 μm 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 sincitiotrofoblasto 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 sincitiotrofoblasto. Dependendo da fase da gestação (até pelo menos o 5º mês de gestação), o sincitiotrofoblasto 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 sincitiotrofoblasto 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 nucléicos (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 sinciciotrofoblasto 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 sinciciotrofoblasto 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 sinciciotrofoblasto, 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 interviloso, 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 últimas 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 macrossomia 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, peptidoglicano, 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

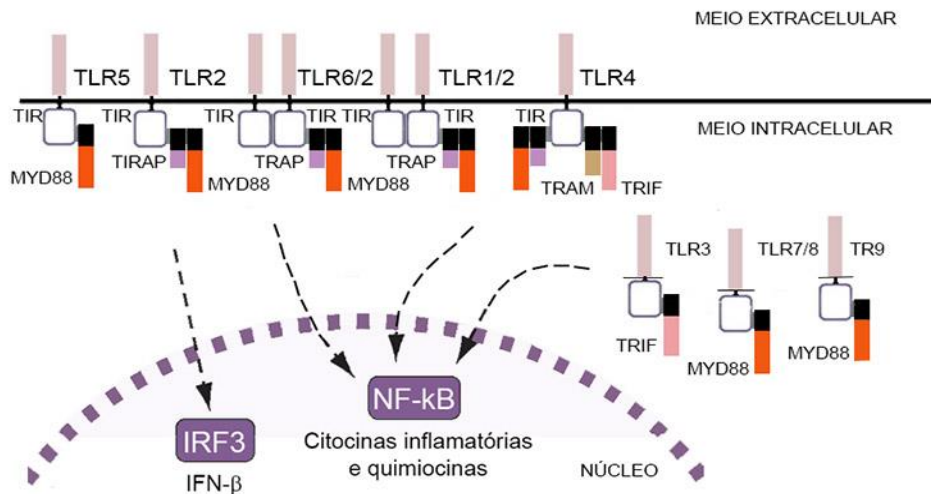
adaptadores são usados em várias combinações pelos TLR diferentes e levam à ativação de MAPK (*mitogen activated protein kinases*) e fatores de transcrição tais como NF- κ B (fator nuclear κ B) e IRFs (fatores reguladores de Interferon) ativando o sistema imunológico inato e induzindo a produção de citocinas 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-κB 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

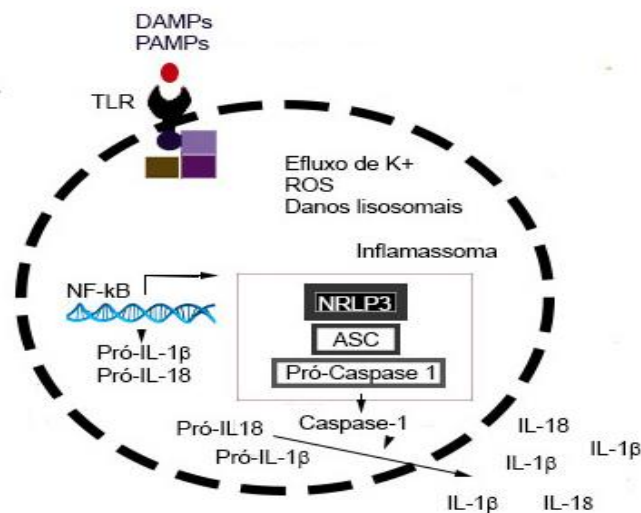
O inflamassoma é um complexo multiproteico intracelular acoplado a sensores de microorganismos e fatores de estresse tecidual que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (caspases) como uma estrutura essencial para a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18. Este 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 de desta via. A transcrição de NF-κB 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-κB em suas formas inativas (pró-IL1 β , pró-IL18) são clivadas pela caspase-1. Após a clivagem das mesmas, estas citocinas são secretadas para a meio externo, participando de outros processos inflamatórios.

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

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 sequencia, 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.

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*

- ABRAHAMAS, 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 diabetes 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**. Cambridge: 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 Obstetrica 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- κ B 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- κ B 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 Obstetrica 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 Cytobiologica**, 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.