

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/09/2017.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Avaliação do inflamassoma NLRP3 e autofagia em placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

INGRID CRISTINA WEEL

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

**BOTUCATU-SP
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Avaliação do inflamassoma NLRP3 e autofagia em placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia

INGRID CRISTINA WEEL

MARIA TEREZINHA SERRÃO PERAÇOLI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientadora: *Maria Terezinha Serrão Peraçoli*

**BOTUCATU-SP
2016**

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Weel, Ingrid Cristina.

Avaliação do inflamassoma NLRP3 e autofagia em
placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia /
Ingrid Cristina Weel. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Maria Teresinha Serrão Peraçoli

Capes: 21104000

1. Autofagia. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Mulheres grávidas.
4. Placenta. 5. Inflamassoma.

Palavras-chave: Autofagia; Inflamassoma; Placenta;
Pré-eclâmpsia; Síndrome anti-fosfolípide.

Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP e nos laboratórios do Department of Obstetrics, Gynecology & Reproductive Sciences na Yale School of Medicine em New Haven, USA, com auxílio da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processos n° 2012/24697-8, 2013/00535-1, 2014/25802-5.

Dedicatoria

Aos meus pais, Cor e Mien, por todo amor e compreensão.

Obrigada por não medirem esforços em todos os momentos e tornarem possível a realização dos meus sonhos.

Agradecimientos

Agradecimento especial

À minha querida orientadora, Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por todos os ensinamentos, dedicação, carinho, acolhimento e conselhos. O meu muito obrigada por ter me orientado em minha jornada acadêmica e por ser essa pessoa tão especial que me fez chegar até aqui.

Agradecimentos

A Deus, por me lembrar do poder que possuo, por me mostrar que sou protegida, guiada e iluminada pela sua presença divina no mais íntimo do meu ser.

Aos meus pais que com tanto amor, compreensão, carinho, dedicação e incentivo fizeram com que os meus estudos, sonhos e desejos se concretizassem. Sem o empenho, a luta, o trabalho e a perseverança de vocês minhas conquistas não teriam êxito. A vocês, meus grandes inspiradores e exemplos, o meu muito obrigada! Amo vocês!

Ao meu melhor amigo, meu amor, Eduardo, que com tanto carinho, compreensão, aconchego, conselhos, mimos e companheirismo me conquista a cada dia. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado, me apoiando e fazendo com que cada obstáculo fosse vencido com a nossa união, proporcionando momentos inesquecíveis em minha vida e de felicidade. Te amo!

Aos meus irmãos Michael e Patrick, as minhas cunhadas, Tamires e Ynara, e ao meu sobrinho, Yuri, meus sinceros agradecimentos por me proporcionarem uma convivência inesquecível de muitos risos e de felicidade ao longo destes anos.

Às minhas amigas, Camila e Juliana, pela amizade verdadeira, consolos, diversão e carinho em todos estes anos que estivemos juntas. Muito obrigada por terem se tornado a minha família de Botucatu, me proporcionando momentos incríveis.

Às minhas amigas e companheiras de tantos anos, Gisele e Suzane, pela amizade maravilhosa que cultivamos desde criança e que sempre me apoiaram em minhas decisões, me dando conselhos e por estarem presentes mesmo que distantes geograficamente.

Aos amigos do IBTEC, Camila, Jaqueline, Leila, Mariana, Marina, Pâmela e Ricardo por todos os auxílios em experimentos, momentos de distração e por fazerem meus dias mais alegres.

Aos amigos, Amanda, Marcel, Carlos e Rosiara por me acolherem tão bem, me proporcionando carinho e momentos de muitos risos.

Aos docentes, funcionários e alunos do Departamento de Microbiologia e Imunologia por todo apoio e compreensão na utilização do laboratório para a realização deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por fornecerem todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, Dra. Daniela Carvalho dos Santos e Dr João Pessoa Araújo Junior por todo o apoio e conhecimento necessário para a realização deste trabalho.

À professora Dra Vikki Abrahams, pela oportunidade de desenvolver projeto na Yale University e pelos grandiosos aprendizados adquiridos.

À seção de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, pelo suporte técnico. Em especial ao funcionário Davi Müller por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, pela oportunidade da realização deste trabalho de doutorado.

Às gestantes que participaram deste trabalho, fazendo com que este estudo se tornasse possível.

À maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP pela disponibilidade na execução deste trabalho.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho. Processos n° 2012/24697-8, 2013/00535-1e 2014/25802-5.

SUMÁRIO

Resumo.....	14
Abstract.....	17
1. Introdução.....	20
1.1. Pré-eclâmpsia, síndrome antifosfolípide e anticorpos antifosfolípidos.....	20
1.2. Inflamassoma.....	24
1.3. Autofagia.....	27
2. Referências.....	31
3. Objetivos.....	38
4. Resultados e discussão.....	40
4.1. Artigo científico I.....	42
4.2. Artigo científico II.....	68
4.3. Artigo científico III.....	93
5. Conclusões.....	112
6. Anexos.....	114

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar”.

-Chico Xavier-

Resumo

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome clinicamente identificada por hipertensão arterial e proteinúria e está associada à produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, deficiência na produção de citocinas reguladoras e aumento nos níveis séricos de anticorpos antifosfolípidos (aPLs) em pacientes com PE grave. Os aPLs são uma família de autoanticorpos que reagem com proteínas ligantes de fosfolípidos, sendo seu principal alvo a beta-2 glicoproteína I (β 2GPI). Estes anticorpos são responsáveis por inibir a diferenciação do sinciciotrofoblasto e restringir a migração trofoblástica, resultando em remodelação anormal das arteríolas espiraladas, alteração característica da PE. O inflamassoma é um complexo proteico que promove a secreção das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18) e, também a secreção da proteína “high-mobility group box 1” (HMGB1) após ativação por patógenos e/ou produtos endógenos associados ao dano celular. A autofagia é uma via de degradação celular ou de eliminação de organelas e proteínas através de processos lisossomais que são importantes para a manutenção da homeostase celular, promovendo a sobrevivência das células em resposta ao estresse. O presente trabalho teve como objetivos: 1. Investigar as proteínas relacionadas ao inflamassoma e à autofagia em placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia e de normotensas; 2. Avaliar a relação existente entre inflamassoma e autofagia em células de trofoblasto extraviloso humano (SW.71), induzida por aPL. Fragmentos placentários foram coletados de 20 gestantes normotensas e de 20 gestantes com pré-eclâmpsia para avaliar a expressão gênica e proteica de NLRP3, caspase-1, IL-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-18, HMGB1, proteína de cadeia leve (LC3B-II), beclin-1 e de “mammalian target of rapamycin” (mTOR). As respostas autofágica e inflamatória e, a expressão de fatores antiangiogênicos também foram analisadas em células SW.71 induzidas por aPL. Os resultados mostraram níveis elevados de RNAm de NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α e HMGB1 em tecido placentário, bem como aumento significativo dos níveis de caspase-1, IL-1 β , TNF- α e HMGB1 em homogenato de placenta de gestantes portadoras de PE quando comparadas às normotensas. A expressão gênica e proteica de IL-18 mostrou-se significativamente diminuída no grupo de gestantes pré-eclâmpicas. A expressão das proteínas relacionadas à autofagia, LC3B-II e beclin-1 e os níveis de RNAm destas proteínas mostraram-se significativamente diminuídos em placenta de gestantes com PE comparados aos de gestantes normotensas. Por outro lado, o RNAm e a proteína de mTOR foram mais elevados nas gestantes com PE em comparação com as normotensas. Nas células SW.71 observou-se que o tratamento com aPL por 8h induziu diminuição significativa da razão LC3B-II/LC3BI seguida de aumento significativo após

72 hr do estímulo. Esses resultados não foram observados na expressão de beclin-1 e p62. Em cultura das células submetidas à inibição do processo autofágico detectou-se aumento na secreção de IL-1 β , IL-8 e endogлина solúvel (sEng), enquanto nas culturas em que a autofagia não foi inibida observou-se diminuição da secreção de sEng e de fms-like tyrosine-kinase-1 solúvel (sFlt-1). Além disso, a permanência do processo autofágico reduziu significativamente a secreção de IL-1 β e IL-8 em células induzidas por aPL. Em conclusão, os resultados obtidos mostram que placenta de gestantes com PE apresentam ativação do inflamassoma NLRP3 e diminuição da resposta autofágica, sugerindo que estes processos podem contribuir para a patogênese da PE. O estímulo de células de trofoblasto extraviloso com aPL é capaz de diminuir a resposta autofágica nessas células por meio de ativação do inflamassoma. O restabelecimento tardio da autofagia nessas células poderia ocorrer, provavelmente, devido à tentativa desse processo em controlar a ativação do inflamassoma.

Palavras Chave: autofagia, inflamassoma, placenta, pré-eclâmpsia e síndrome anti-fosfolípide.

Abstract

Preeclampsia (PE) is a syndrome clinically identified by hypertension and proteinuria and is associated with excessive production of proinflammatory cytokines, deficiency in the production of regulatory cytokines, and increased serum levels of antiphospholipid antibodies (aPLs) in patients with severe forms of PE. aPLs are a family of autoantibodies that react with phospholipid binding proteins, which the main target is beta 2 glycoprotein-I (β 2GPI). These antibodies are responsible for inhibiting the differentiation of syncytiotrophoblast and restrict trophoblast migration, resulting in abnormal remodeling of the spiral arterioles, characteristic alteration in PE. The inflammasome is a protein complex that promotes the secretion of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin 18 (IL-18), and also the secretion of high-mobility group box 1 (HMGB1) protein after activation by pathogens and/or endogenous products associated with cellular damage. Autophagy is a pathway of cell degradation or elimination of organelles and proteins by lysosomal processes that are important for the maintenance of cellular homeostasis by promoting the survival of cells in response to stress. The objectives of the present study are: 1. To investigate the proteins related to inflammasome and autophagy in placenta from pregnant women with PE and from normotensive control; 2. To evaluate the relationship between inflammasome and autophagy in human extravillous trophoblast cells (SW.71) induced by aPL. Placental fragments were collected from 20 normotensive pregnant women and from 20 pregnant women with PE to evaluate gene and protein expression of NLRP3, caspase-1, IL-1 β , tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), IL-18, HMGB1, light chain protein (LC3B- II), beclin-1 and mammalian target of rapamycin (mTOR). The autophagic and inflammatory responses as well as the expression of antiangiogenic factors were also analyzed in SW.71 cells induced by aPL. The results showed higher levels of mRNA for NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α and HMGB1 in placental tissue as well as significant increase in caspase-1, IL-1 β , TNF- α and HMGB1 levels in placental homogenate from women with PE compared with the normotensive group. Gene and protein expression of IL-18 was significantly decreased in the group of preeclamptic women. The expression of proteins related to autophagy, LC3B-II and beclin-1 and the mRNA levels of these proteins were significantly decreased in placenta of women with PE compared with the normotensive ones. On the other hand, mRNA and protein for mTOR were higher in women with PE. In SW.71 cells it was observed that the treatment with aPL for 8h induced significant decrease in LC3B-II/LC3BI ratio, followed by its significant increase after 72hr of aPL stimulation. These results were not observed in the expression of beclin-1 and p62. When SW.71 cells were

submitted to autophagy inhibition a significant increase in IL-1 β , IL-8 and soluble endoglin (sEng) was detected, whereas the maintenance of autophagy lead to reduced secretion of sEng and fms-like tyrosine kinase-1-soluble (sFlt-1). Furthermore, the maintenance of the autophagic process significantly reduced the secretion of IL-1 β and IL-8 in cells induced by aPL. In conclusion, the results demonstrated that placenta from preeclamptic women shows NLRP3 inflammasome activation and decreased autophagic response suggesting that these processes may contribute to the pathogenesis of PE. The stimulus of extravillous trophoblast cells with aPL caused decrease in the autophagic response in these cells by inflammasome activation, leading to delayed recovery of autophagy, which may probably occur due to an attempted of inflammasome control by the autophagy process.

Keywords: autophagy, inflammasome, placenta, preeclampsia, antiphospholipid syndrome.

Introdução

1. Introdução

1.1. Pré-eclâmpsia, síndrome antifosfolípide e anticorpos antifosfolípidos

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome que incide entre 2% e 8% das gestações e tem sérios impactos na saúde materna e fetal (Kane et al., 2014). É uma doença sistêmica, caracterizada por múltiplas alterações no organismo materno e clinicamente identificada por hipertensão arterial e proteinúria, que se manifestam após a 20ª semana de gestação (NHBPEP, 2000; De Oliveira et al., 2010).

Embora esta síndrome não esteja completamente compreendida, há relatos de que sua fisiopatologia é influenciada tanto por fatores maternos como placentários (Robillard, 2002; Redman & Sargent, 2005). Fundamentada nesse conceito, a literatura sugere a interação de vários mecanismos responsáveis pela característica multisistêmica da doença, tais como: placentação inadequada (Pijnenborg et al., 1983; Royle et al., 2009), disfunção endotelial (Khan et al., 2005), angiogênese insuficiente (Levine et al., 2006), má adaptação imunológica (Dekker & Sibai, 1999), estresse oxidativo (Gupta et al., 2005; Redman & Sargent, 2000; 2005) e resposta inflamatória excessiva (Redman et al., 1999; Redman & Sargent, 2003).

Durante a placentação normal, as arteríolas espiraladas maternas são invadidas pelo trofoblasto, resultando em remodelação da arteríola espiralada e assegurando um suprimento sanguíneo adequado para a placenta e o feto. No entanto, em placentas de gestantes com PE o trofoblasto não induz invasão adequada, gerando defeitos na remodelação da arteríola espiralada e resultando em má perfusão (Brosens et al., 1972; George & Granger, 2011). Roberts e Hubel (1999) sugerem que a PE tem seu início devido ao baixo fluxo sanguíneo uteroplacentário que resulta em hipóxia placentária. Portanto, a placenta tem papel essencial nessa doença, pois problemas na implantação e no

processo de placentação culminam em redução da perfusão sanguínea e, portanto, em hipóxia/isquemia placentária (Amash et al., 2007; Gilbert et al., 2008), que também pode causar restrição de crescimento fetal intrauterino (Hung et al., 2004).

Assim, a PE parece ser resultante de uma resposta inflamatória materna exacerbada, que inclui ativação de células inflamatórias e células endoteliais (Schuiling et al., 1997; Redman et al., 1999; Borzychowski et al., 2006). Segundo a literatura, essa patologia é caracterizada por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) (Johnson et al., 2002; Redman & Sargent, 2003; Luppi & Deloia, 2006; Peraçoli et al., 2007) e quimiocinas (Visser et al., 2007), bem como por alterações na produção de citocinas reguladoras (Pestka et al., 2004; Peraçoli et al., 2008; 2013; Weel et al., 2016). Além disso, é descrito que altos níveis de ácido úrico no plasma de pacientes com PE podem estar relacionados com a patogênese da PE por promover a resposta inflamatória (Bainbridge & Roberts, 2008). Dados da literatura, também revelam que em pacientes com PE grave, com idade gestacional menor que 34 semanas, observa-se um aumento de 20% no nível de anticorpos antifosfolípides (aPLs) quando comparadas as gestantes que não tiveram complicações na gestação e no parto (Heilmann et al., 2011).

Os aPLs são uma família de auto anticorpos que reagem com proteínas ligantes de fosfolípidios, sendo o principal alvo a beta 2 glicoproteína I (β 2GPI) que é constitutivamente expressa em trofoblasto placentário, especialmente em populações de trofoblasto extraviloso que são responsáveis pela invasão da decídua e remodelação da arteriola uterina espiralada (McNeil et al., 1990; Chamley et al., 1999; Quenby et al., 2005). Estes anticorpos são responsáveis por inibir a diferenciação do sinciciotrofoblasto (di Simone et al., 2005; D'Ippolito et al., 2014) e restringir a migração trofoblástica, resultando em remodelação anormal das arteríolas espiraladas (Mulla et al., 2010), visto que os alvos são as β 2GPI expressas em trofoblastos placentários.

Esses aPLs são característicos da síndrome antifosfolípide (SAF) que é definida como uma doença autoimune, caracterizada pela presença de trombose, aborto recorrente e níveis elevados de aPLs (Hughes, 1983), os quais foram descritos por estarem relacionados com a prevalência e gravidade da síndrome HELLP (hemólise, níveis elevados de enzimas hepáticas e baixa quantidade de plaquetas) (Pauzner et al., 2003; Le Thi Thuong et al., 2005), porém pouco se sabe sobre o envolvimento do aPL na patogênese da PE e da síndrome HELLP. Alguns critérios de diagnóstico para a identificação de mulheres com SAF estão descritos na literatura e que incluem diagnóstico clínico e laboratorial. Os critérios clínicos incluem aborto recorrente antes da 10ª semana de gestação, obito fetal após a 10ª semana de gestação e histórico de trombose venosa ou arterial na presença ou ausência da gestação (de Jesus et al., 2014). Os critérios laboratoriais incluem a identificação da presença de anticorpos anticoagulante lúpico, assim como aPL (anticorpos IgG/IgM, anti- β 2GPI) e anticorpos anti-cardiolipina (Miyakis et al., 2006; Heilmann et al., 2011).

Em pacientes com SAF, as complicações da gestação estão associadas à inflamação na interface materno-fetal (Berman et al., 2005; Girardi et al., 2003; Mulla et al., 2009) e insuficiência placentária associada com redução de invasão trofoblástica (Alvarez et al., 2015; Mulla et al., 2010; Sebire et al., 2002). Estes achados clínicos são comprovados por estudos *in vitro* que descrevem a alteração na função celular de trofoblastos de primeiro trimestre quando β 2GPI é reconhecido pelo aPL. Essas alterações causadas são altamente relevantes, pois induzem nas células trofoblásticas a produção de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e Interleucina 8 (IL-8) (Mulla et al., 2009; Mulla et al., 2013); ocorrendo, também, inibição da migração espontânea do trofoblasto (Mulla et al., 2010; Ulrich et al., 2015); e aumento na secreção do fator anti-angiogênico, a endogлина solúvel (sEng) (Carroll et al., 2011).

De modo geral, estas duas síndromes, PE e SAF, estão relacionadas com uma resposta inflamatória exacerbada e o desenvolvimento destas doenças é altamente prejudicial tanto para mãe quanto para o feto. Desta forma, estudos para a melhor compreensão destas síndromes são fundamentais para desvendar os mecanismos que envolvem o seu aparecimento.

Conclusões

5. Conclusões

I- Placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia apresentaram ativação do inflamassoma NLRP3 e caspase 1 com aumento de expressão de IL-1 β , TNF- α e HMGB1. Esses resultados sugerem que este complexo inflamatório pode estar envolvido na resposta inflamatória exacerbada observada em placenta de gestantes pré-eclâmplicas.

II- Placentas de gestantes com pré-eclâmpsia apresentaram diminuição na resposta autofágica, caracterizada pela menor expressão de LC3B-II e beclin-1 e aumento de expressão do mTOR, sugerindo que esta diminuição pode estar envolvida na patogênese da pré-eclâmpsia.

III- O anticorpo anti-fosfolípide é capaz de reduzir a resposta autofágica em células de trofoblasto extraviloso, que por sua vez permite a ativação do inflamassoma, com secreção de IL-1 β e de IL-8 mediada pelo TLR4. Além disso, sugere-se que ocorra um reestabelecimento da autofagia desencadeada pela ativação do inflamassoma.

O presente estudo evidenciou a participação de autofagia e inflamassoma nas patologias da gestação, mostrando que ocorre uma resposta inflamatória exacerbada tanto na pré-eclâmpsia quanto em células trofoblásticas de primeiro trimestre induzidas por anticorpo anti-fosfolípide. Além disso, mostrou que o processo autofágico encontra-se deprimido em placenta de gestante com pré-eclâmpsia e em células de trofoblasto induzidas por aPL. Estes resultados revelam que mecanismos complexos estão envolvidos em patologias da gestação e que merecem uma investigação mais aprofundada.