

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 23/02/2019.



**unesp**

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



# **Envolvimento do inflamassoma na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia**

**MARIANA ROMÃO VEIGA**

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  
2017**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Envolvimento do inflamassoma na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia**

**MARIANA ROMÃO VEIGA**

**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*.

**BOTUCATU – SP  
2017**



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-CRÊ 8/5651

Romao Veiga, Mariana.

Envolvimento do inflamassoma na imunidade inata e adaptativa em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Mariana Romao Veiga. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli  
Capes: 21104000

1. Citocinas. 2. Imunidade. 3. Células T - Receptores. 4. Pré-eclâmpsia. 5. Monócitos. 6. Resposta imune.

Palavras-chave: Citocinas; DAMPs; Monócitos; Pré-eclâmpsia; Subpopulações de células T.

Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP - Botucatu com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processos nº 2012/24697-8, 2013/00534-5.



***DEDICATÓRIA***

Dedico este trabalho à minha família pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Que sempre me impulsiona em direção à minha vitória frente aos desafios da vida

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos”.

Antoine de Saint-Exupéry

Aos meus pais, José Carlos e Helena, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la e que, com muito amor e cuidado, me levaram a acreditar que tudo é possível!

Ao meu esposo, José Alberto (Beto), por todos esses anos de muito amor, amizade, apoio e felicidade.

Aos meus irmãos, Danilo e Gustavo, pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo, cuidando sempre dessa caçulinha.

Aos meus sobrinhos, Natália, Murilo, João Pedro e Felipe que alegam a minha vida todos os dias!

À minha Tia Maria, segunda mãe que esteve sempre presente e com muito carinho me apoiou nessa jornada.

Ao Sr. Veiga e D. Marisa, Tia Sílvia, Vó Flora, Luciana e Erick por me acolherem em sua família com tanto carinho. Obrigada por todo apoio!

À toda minha família, minha cunhada Renata, Vó Lourdes, Tia Lúcia, Tio Wilson, a todos tios, tias, primos e primas, obrigada por serem meu porto seguro, mais que qualquer outra coisa, por serem tudo o que acredito ser uma FAMÍLIA. Vocês são a minha vida!



***AGRADECIMENTOS***

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha orientadora Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por todos os ensinamentos, sabedoria, compreensão e ajuda, por ser exemplo, profissional e principalmente pessoal. Meu muito obrigada pelo carinho, amizade e dedicação em todos esses anos de trabalho e convívio.

*“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas e nos marcam para sempre.”*

Cecília Meireles

## **AGRADECIMENTOS**

Às meninas do LAB 3, Mariana, Vanessa e Priscila pela amizade, ajuda, ensinamentos, erros e risadas, obrigada por produzirem um ambiente de trabalho tão divertido e agradável.

Aos meus queridos amigos, Paola e Fernando, pelas horas de diversão, discussão, alegria e por permitirem que eu fizesse parte de suas vidas.

Aos amigos de longe, Pamella (Pam), Patrícia (Paty), Marcelo (Korone), Wilson (Fuzita), William, Camila (Cami), Ana Paula (Aninha), Leandro (Ledo), Sidarta e Amanda (Cacau), que apesar de longe, estão sempre perto, obrigada por todas as conversas!

Aos amigos, Célio, Alessandra, Cristiano, Fernanda (Felícia), Vitor, Rafael (Banana), Bruno, Adriana, Daniel (Lello), Juliana, Marcelo (Bolinha) e Jaqueline que tornaram meus dias muito mais felizes.

Ao Dr. Peraçoli, Dra. Vera, Dr. Leandro, Dr. Roberto e aos demais docentes e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por sempre estarem disponíveis a ajudar.

Ao prof. João Pessoa, prof. Ramon e Dra. Graziela, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por disponibilizarem seu laboratório e colaborarem com o andamento de meu trabalho.

A todos docentes, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por toda ajuda e pela boa convivência.

Aos funcionários da Unidade Básica de Saúde do Jardim Iolanda, Botucatu, sempre prontas a ajudar.

Às gestantes que aceitaram participar desse trabalho, meu muito obrigada, sem vocês nada seria possível.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, por possibilitar a realização deste trabalho, e aos funcionários pela disposição e eficiência em todas as necessidades.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro para realização deste projeto Processos nº 2012/24697-8 e 2013/00534-5.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e que principalmente contribuíram para formação da pessoa que sou hoje.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Skłodowska Curie



## *SUMÁRIO*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
CAPÍTULO I.....	24
CAPÍTULO II.....	41
CAPÍTULO III.....	74
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>102</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>104</b>
ANEXO 1 – ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.....	105
ANEXO 2 – PARECER DO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA.....	144
ANEXO 3 – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	150
<b>OUTRAS ATIVIDADES</b> .....	<b>153</b>
1.1. HISTÓRICO ESCOLAR FINAL (ANEXO 01).....	154
1.2. ATA DE DEFESA (ANEXO 02).....	154
1.3. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS.....	154
1.4. PUBLICAÇÕES.....	154
1.5. ANAIS DE EVENTOS CIENTÍFICOS.....	155
1.6. PRÊMIOS.....	156
1.7. TREINAMENTO TÉCNICO.....	157
1.8. AVALIAÇÃO DE TRABALHOS.....	157



***RESUMO***

**Introdução:** A pré-eclampsia (PE) destaca-se como uma das principais causas de morbidade e mortalidade tanto materna como fetal, se caracteriza por ativação anormal do sistema imune inato e adaptativo. No plasma de gestantes portadoras de PE encontram-se níveis elevados de estruturas moleculares associadas ao estresse e morte celular, denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) como, proteína de choque térmico (Hsp70), HMGB1 (*high mobility group box 1*), Hialurona (HA) e Ácido Úrico, que parecem contribuir diretamente com a patogênese dessa doença. Essas DAMPs ligam-se a receptores presentes em células da imunidade inata, podendo ativar um complexo intracelular denominado inflamassoma, responsável pelo processamento e liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18. Essas citocinas são potentes mediadores inflamatórios e importantes na ativação da resposta imune adaptativa, auxiliando a ativação de células T em Th17 e Th1, respectivamente. Na PE, a ocorrência de resposta inflamatória sistêmica parece decorrer da deficiência no controle de células T efectoras por células T reguladoras (Treg). Portanto, o balanço entre células Treg e Th17 pode ser crítico para a tolerância ao feto e para a prevenção da doença.

**Objetivos:** O presente trabalho teve como objetivos: Avaliar o estado de ativação, endógena e induzida pelas DAMPs (urato monossódico (MSU), HA e Hsp70), em monócitos, pela identificação da presença do inflamassoma e associação com a produção de citocinas; Avaliar o envolvimento das subpopulações de células T (Th1, Th2, Treg e Th17) pela análise dos fatores de transcrição e pelo padrão de citocinas produzidas por essas células estimuladas com as DAMPs (MSU, HA e Hsp70).

**Métodos e Resultados:** Foram estudadas 20 gestantes portadoras de PE, 20 gestantes normotensas (GN) e 20 mulheres saudáveis não grávidas (MNG). O plasma foi separado e armazenado à -80°C para dosagem das DAMPs (ácido úrico, HA, HMGB1 e Hsp70). Monócitos de sangue periférico foram incubados na presença ou ausência das DAMPs (MSU, HA e Hsp70). O sobrenadante obtido após 18h de cultivo foi aspirado e empregado para dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18 por ELISA. A presença de inflamassoma nessas células foi avaliada pela quantificação de RNAm de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$  e HMGB1 por RT-qPCR após 4h de cultura. Os resultados mostraram concentração plasmática elevada de MSU, HA, Hsp70 e HMGB1 e expressão gênica endógena de

NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e HMGB1 significativamente maior em gestantes com PE em comparação aos grupos GN e MNG. Em relação à produção endógena de citocinas, IL-1 $\beta$  foi maior no grupo PE em relação aos grupos GN e MNG, enquanto IL-18 e TNF- $\alpha$  estão aumentadas apenas no grupo PE comparado ao grupo GN. O estímulo de monócitos de gestantes pré-eclâmpticas e de mulheres não grávidas com MSU induziu aumento na expressão gênica de NLRP3, caspase-1 e TNF- $\alpha$  em relação à expressão endógena nesses grupos, enquanto esse efeito não foi observado em gestantes normotensas. Quando os monócitos foram estimulados com HA observou-se aumento da expressão de RNAm de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e HMGB1, enquanto Hsp70 estimulou apenas a expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ . A análise das citocinas por ELISA mostrou que monócitos de gestantes com PE produziram níveis endógenos e estimulados com MSU mais elevados de IL-1 $\beta$ , IL-18 e TNF- $\alpha$  em comparação ao grupo GN. Todos os grupos apresentaram aumento de IL-1 $\beta$  após estímulo com HA e aumento de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  quando estimulados com Hsp70. Para estudo das subpopulações de células T as células mononucleares do sangue periférico foram avaliadas pela expressão endógena dos fatores de transcrição para células T-bet (Th1), GATA3 (Th2), RORc (Th17) e Foxp3 (Treg) por citometria de fluxo. Essas células foram cultivadas na ausência ou presença das DAMPs e o sobrenadante foi empregado para determinação das citocinas de perfil Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ ), Th2 (IL-4), Treg (IL-10 e TGF- $\beta$ 1) e Th17 (IL-17 e IL-22) por ELISA. Os resultados mostraram polarização para perfis inflamatórios Th1/Th17 e diminuição de perfis anti-inflamatórios Th2/Treg em gestantes portadoras de PE associados a níveis endógenos elevados das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e diminuídos de TGF- $\beta$  e IL-10 quando comparadas com gestantes normotensas. O estímulo das células com MSU induziu aumento de IFN- $\gamma$ , IL-22 em todos os grupos estudados, enquanto os estímulos com MSU e HA induziram aumento de IL-17 somente no grupo de normotensas. As DAMPs MSU e Hsp70 induziram aumento significativo da produção de TNF- $\alpha$  nos grupos de PE e MNG. Níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 foram produzidos por células de gestantes portadoras de PE estimuladas com MSU, HA e Hsp70, enquanto HA e Hsp70 induziram diminuição da produção dessa citocina em gestantes normotensas.

**Conclusões:** A maior expressão gênica endógena de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$ , HMGB1 e TNF- $\alpha$  em monócitos de gestantes pré-eclâmpticas

confirma o estado de ativação dessas células na PE. Assim como a ativação endógena para perfil Th1/Th17 e expressão elevada de citocinas inflamatórias em gestantes pré-eclâmpicas demonstra o desbalanço inflamatório presente nessas gestantes. As DAMPs foram capazes de estimular tanto a resposta imune inata como a adaptativa em gestantes pré-eclâmpicas sugerindo que essas alarminas desempenham papel na ativação do sistema imune e na liberação de citocinas inflamatórias participando na patogênese dessa importante síndrome da gestação.

**Palavras-chave:** Pré-eclâmpsia, citocinas, DAMPs, monócitos e subpopulações de células T.



***ABSTRACT***

**Introduction:** Preeclampsia (PE) stands out as one of the main causes of morbidity and mortality both maternal and fetal, characterized by abnormal activation of the innate and adaptive immune system. Plasma of pregnant women with PE shows high levels of molecular structures associated to stress and cell death, called damage associated molecular patterns (DAMPs) such as heat shock protein (Hsp70), HMGB1 (high mobility group box 1), Hyaluronan (HA) and Uric Acid, which seem to contribute directly to the pathogenesis of this disease. These DAMPs bind to receptors present in cells of innate immunity, and can activate an intracellular complex called inflammasomes, responsible for the processing and release of IL-1 $\beta$  and IL-18. These cytokines are potent inflammatory mediators and important in the activation of the adaptive immune response, aiding the activation of T cells in Th17 and Th1, respectively. In PE, the occurrence of a systemic inflammatory response appears to be a consequence of deficiency in effector T cell control by regulatory T cells (Treg). Therefore, the balance between Treg and Th17 cells may be critical for fetus tolerance and disease prevention.

**Objectives:** This study aimed to: evaluate the activation state, endogenous and induced DAMPs (monosodium urate (MSU), HA and Hsp70) in monocytes, identifying the presence of inflammasomes and association with cytokine production; assess the involvement of T cell subpopulations (Th1, Th2, Treg and Th17) by the analysis of transcription factors and the pattern of cytokines produced by these cells stimulated with DAMPS (MSU HA and Hsp70).

**Methods and Results:** Twenty pregnant women with PE, 20 normotensive pregnant women (NT) and 20 healthy non-pregnant women (NP) were studied. Plasma was separated and stored at -80°C for determination of DAMPs (uric acid, HA, HMGB1 and Hsp70). Peripheral blood monocytes were incubated in the presence or absence of DAMPs (MSU, HA and Hsp70). The supernatant obtained after 18 h of culture was aspirated and used for determination of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-18 by ELISA. The presence of inflammasomes in these cells was evaluated by quantification of mRNA of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$  and HMGB1 by RT-qPCR after 4h of culture. The results showed high plasma concentration of MSU, HA, Hsp70 and HMGB1 and endogenous gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and HMGB1 significantly higher in pregnant women with PE compared to NT and NP groups. In relation to the

endogenous production of cytokines, IL-1 $\beta$  was higher in the PE group compared to the NT and NP groups, while IL-18 and TNF- $\alpha$  were increased only in the PE group compared to the NT group. Monocytes of pre-eclamptic and non-pregnant women stimulated with MSU induced an increase in the gene expression of NLRP3, caspase-1 and TNF- $\alpha$  regarding endogenous expression in these groups, however this effect was not observed in normotensive pregnant women. When monocytes were stimulated with HA, increased mRNA expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and HMGB1 was observed, whereas Hsp70 stimulated TNF- $\alpha$  mRNA expression only. Cytokine analysis by ELISA showed that monocytes from pregnant women with PE produced higher levels endogenous and stimulated with MSU of IL-1 $\beta$ , IL-18 and TNF- $\alpha$  compared to the NT group. All groups showed increase of IL-1 $\beta$  after stimulation with HA and increase of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  when stimulated with Hsp70. For the study of T cell subpopulations, peripheral blood mononuclear cells were evaluated by endogenous expression of transcription factors T-bet (Th1), GATA3 (Th2), RORc (Th17) and Foxp3 (Treg) cells by flow cytometry. These cells were cultured in the absence or presence of DAMPs and the supernatant was used to determine cytokines Th1 (IFN- $\gamma$  and TNF- $\beta$ ), Th2 (IL-4), Treg (IL-10 and TGF- $\beta$ 1) and Th17 (IL-17 and IL-22) by ELISA. The results showed polarization for Th1/Th17 inflammatory profiles and decrease of Th2/Treg anti-inflammatory profiles in pregnant women with PE associated with elevated endogenous levels of the inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 and decreased TGF- $\beta$  And IL-10 when compared with normotensive pregnant women. Stimulation of the cells with MSU induced an increase of IFN- $\gamma$ , IL-22 in all studied groups, whereas the stimuli with MSU and HA induced IL-17 increase only in the normotensive group. DAMPs MSU and Hsp70 induced a significant increase in TNF- $\alpha$  production in the PE and NP groups. Elevated levels of TGF- $\beta$ 1 were produced by cells of pregnant women with PE stimulated with MSU, HA and Hsp70, whereas HA and Hsp70 induced decreased production of this cytokine in normotensive pregnant women.

**Conclusions:** The higher endogenous gene expression of NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$ , HMGB1 and TNF- $\alpha$  in monocytes of pre-eclamptic women confirms the activation state of these cells in PE. As well as the endogenous activation of Th1/Th17 profile and high expression of inflammatory cytokines in pregnant women with PE demonstrates the inflammatory imbalance present in these pregnant women.

DAMPs were able to stimulate both the innate and adaptive immune response in preeclamptic women suggesting that these alarmins play a role in the activation of the immune system and in the release of inflammatory cytokines participating in the pathogenesis of this important gestational syndrome.

**Keywords:** Pre-eclampsia, cytokines, DAMPs, monocytes and T-cell subsets.



# *INTRODUÇÃO*

A pré-eclâmpsia é uma síndrome específica da gestação humana, que, entre outras manifestações, apresenta desvio da resposta imune para perfil inflamatório intenso, apresentando ativação endógena de células da imunidade inata e adaptativa. Grande parte das gestantes que desenvolvem essa síndrome, não apresentam sinais clínicos de infecção, portanto, acreditamos que a inflamação estéril participa na indução e manutenção dessa inflamação exacerbada presente nessas gestantes.

Essa inflamação estéril pode ser desencadeada pela presença de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que se encontram aumentados no plasma dessas gestantes, contribuindo tanto para a inflamação placentária local como para a inflamação sistêmica e a disfunção endotelial.

Nesse contexto de inflamação estéril é interessante conhecer a capacidade dessas DAMPs em ativar a resposta inflamatória em gestantes portadoras PE, tanto na imunidade inata, como na imunidade adaptativa.

O presente trabalho foi então formulado e discutido em três capítulos com formato de artigos.

### **Capítulo 1 – artigo científico publicado**

Endogenous and Uric Acid-Induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia. PLoS One. 2015; 10(6):e0129095. doi: 10.1371/journal.pone.0129095.

### **Capítulo 2 – artigo submetido para publicação**

DAMPs induzem inflamação em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia.

### **Capítulo 3 – manuscrito em preparação**

DAMPs induzem polarização da imunidade adaptativa para perfil inflamatório em gestantes portadoras de pré-eclâmpsia