



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Priscila Rezeck Nunes**

**EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE  
AUTOFAGIA EM TECIDO PLACENTÁRIO**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina, Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Mestra em  
Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Gustavo de Oliveira  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

**Botucatu  
2017**

Priscila Rezeck Nunes

## EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE AUTOFAGIA EM TECIDO PLACENTÁRIO

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”,  
Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Mestra  
em Ginecologia, Obstetrícia e  
Mastologia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Gustavo de Oliveira  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Botucatu  
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-CRB 8/5651

Nunes, Priscila Rezeck.

Efeito do estresse oxidativo sobre autofagia em tecido placentário / Priscila Rezeck Nunes. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Leandro Gustavo de Oliveira

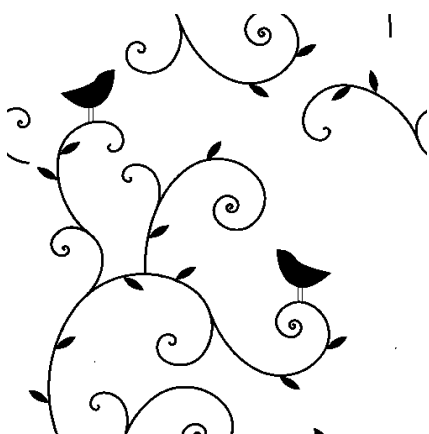
Coorientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Capes: 40101150

1. Stress oxidativo. 2. Autofagia. 3. Resposta imune.  
4. Citocinas. 5. Placenta.

Palavras-chave: Autofagia; Citocinas; Estresse oxidativo; Inflamassoma; Placenta.

*Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia da Reprodução 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). Processo nº  
2014/25611-5*



# *Dedicatória*

Este trabalho é dedicado à minha família.

*"Filho meu, ouve a instrução de teu pai, e não deixes o ensino de tua mãe. Porque eles serão uma grinalda de graça para a tua cabeça, e colares para o teu pescoço." (Provérbios 1:8-9)*

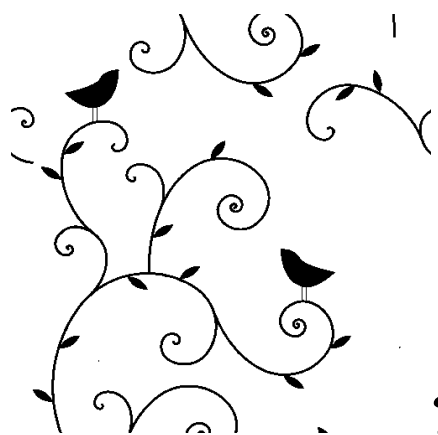
Aos meus pais, Monica e Marco, razões pelas quais cheguei até aqui. Meus exemplos de vida e de perseverança. Obrigada por não medirem esforços para que eu vencesse cada etapa até hoje, sempre me apoiando e provendo tudo que eu precisei. Vocês são tudo para mim!

Ao meu irmão, André, por sempre estar presente em minha vida e me dar a alegria e honra de ser sua irmã.

Aos meus avós, Rezeck e Antonieta e Manuel e Dulce, alicerces da minha família e grandes exemplos de amor e bondade para mim.

Aos meus tios e tias: Paula e Léo, Nando e Andréa, Vanilda e Adriano, Cristina e Marcy, Fábio e Elaine, por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus primos e eternas crianças para mim: Luiza, Ana Clara, João Pedro, João Gabriel, João Vitor, Davi e Rafael (e Luke), por serem parte da minha vida e por todos os momentos compartilhados.



*Agradecimentos*

À Deus, por me ensinar que tudo tem sua hora certa, e por sempre me proteger e me colocar no caminho certo.

*“Entender a vontade de Deus nem sempre é fácil, mas crer que ele está no comando e tem um plano pra nossa vida, faz a caminhada valer a pena.” (Marian V. Liantava)*

À Santa Terezinha e Nossa Senhora de Fátima, por passarem na frente de meus passos e por me concederem tantas graças.

Ao meu namorado Diego por todo apoio, compreensão e amor. A Maria, Antonio e Pérola e todos das famílias Mirandola e Vieira por me acolherem em sua família com tanto carinho.

Às minhas amigas Nayara, Carolina, Andressa, Camila, Fernanda, Natalia e Nanda por fazerem parte de minha vida há tanto tempo e por sempre estarem presentes, mesmo a distância.

Aos amigos Natalia, Daniel e Érica pela amizade que surgiu na faculdade e que compartilhamos até hoje.

Às meninas e amigas do Lab 3, Mazinha, Vanessa e Mariana por sempre estarem dispostas a ajudar, pelos ensinamentos, palavras, pela cumplicidade e por fazerem do laboratório um lugar de trabalho maravilhoso.

À minha coorientadora e orientadora do coração, Professora Terezinha, por sempre me apoiar e me incentivar, fazendo com que eu não desistisse. A senhora é um exemplo para mim.

Ao Professor Leandro, por todas as ideias e momentos de aprendizado. Muito obrigada!

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

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por toda a ajuda.

Às enfermeiras do ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia, sempre prontas a ajudar.

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

Ao programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, por possibilitar a realização deste trabalho, e aos funcionários (principalmente à Solange) pela disposição e eficiência em todas as necessidades.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro para realização deste projeto Processo nº 2014/25611-5.

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

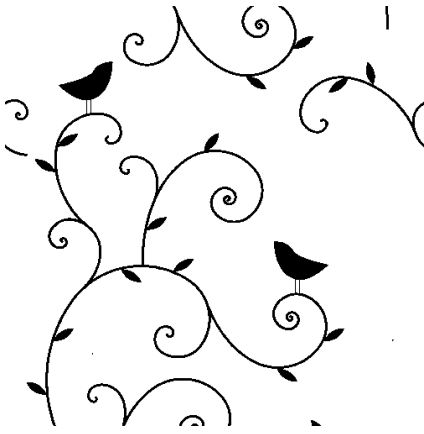
*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

*Marthín Luther King*

## Sumário

|                                                                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo 1.....</b>                                                                                                            | <b>13</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                         | <b>22</b> |
| 1.1. Estresse Oxidativo e Gestação .....                                                                                          | 22        |
| 1.2. Autofagia, Inflamassoma e Gestação .....                                                                                     | 24        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                                                                         | <b>29</b> |
| 2.1. Objetivo Geral .....                                                                                                         | 29        |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                                                                                  | 30        |
| <b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>                                                                                               | <b>30</b> |
| 3.1. Gestantes.....                                                                                                               | 30        |
| 3.2. Aspectos éticos .....                                                                                                        | 30        |
| 3.3. Critérios de inclusão .....                                                                                                  | 31        |
| 3.4. Critérios de não-inclusão .....                                                                                              | 31        |
| 3.5. Cálculo do tamanho amostral .....                                                                                            | 31        |
| 3.6. Coleta das placentas .....                                                                                                   | 31        |
| 3.7. Cultura de explantes placentários na presença de peróxido de hidrogênio.....                                                 | 32        |
| 3.8. Análise da viabilidade celular dos explantes placentários .....                                                              | 33        |
| 3.9. Marcadores de estresse oxidativo .....                                                                                       | 34        |
| 3.10. Avaliação da expressão de transcritos relacionados à inflamação e autofagia .....                                           | 34        |
| 3.11. Padronização da escolha do normalizador utilizado na técnica de RT-qPCR.....                                                | 37        |
| 3.12. Determinação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ em sobrenadantes de culturas de explantes placentários ..... | 39        |

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.13. Análise estatística .....                                                             | 40        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                                                  | <b>40</b> |
| 4.1. Determinação da enzima lactato desidrogenase em cultura de explantes placentários..... | 40        |
| 4.2. Determinação dos marcadores de estresse oxidativo .....                                | 41        |
| 4.3. Expressão gênica de NLRP3 e caspase-1 .....                                            | 44        |
| 4.4. Expressão gênica das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10.....               | 44        |
| 4.5. Determinação de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 pela técnica de ELISA .....       | 46        |
| 4.6. Análise da expressão ao nível transcricional de LC3-II, beclin-1 e p62<br>47           |           |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>                                                                    | <b>48</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                  | <b>57</b> |
| <b>Capítulo 2 .....</b>                                                                     | <b>66</b> |
| <b>Anexos .....</b>                                                                         | <b>99</b> |



# *Capítulo 1*

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”. (Marcel Proust)*

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ANOVA:** análise de variância

**DNAc:** DNA complementar

**cm:** centímetros

**ct:** *cycle threshold*

**DAMPs:** padrões moleculares associados ao dano

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**ELISA:** ensaio de imunoabsorção enzimática

**EROs:** espécies reativas de oxigênio

**g:** gravidade

**GAPDH:** gliceraldeído 3-fosfato- desidrogenase

**h:** horas

**HA:** hialurona

**Hg:** mercúrio

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**hCG:** gonadotrofina coriônica humana

**Hsp:** proteína de choque térmico

**IL:** interleucina

**JEG-3:** linhagem de células de coriocarcinoma

**LC3:** proteína de cadeia leve 3

**LDH:** lactato desidrogenase

**min:** minuto

**mTOR:** proteína-alvo da rapamicina em mamíferos

**NF-KB:** fator nuclear kappa B

**NLRP:** receptor nod-like

**°C:** graus Celsius

**O<sup>2-</sup>:** ânion superóxido

**p:** nível de significância

**PBS:** solução salina tamponada (*phosphate buffered saline*)

**PE:** pré-eclâmpsia

**pO<sub>2</sub>:** tensão de oxigênio

**r:** coeficiente de correlação

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>**: RNA mensageiro

**RPMI**: meio sintético complexo (*Roswell Park Memorial Institute*)

**RT- qPCR**: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

**s**: segundo

**SD**: desvio padrão

**SOD**: superóxido dismutase

**SBF**: soro bovino fetal

**TNF- $\alpha$** : fator de necrose tumoral alfa

**TRAF6**: fator de associação ao receptor de TNF

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

**M**: molar

**mg**: miligramas

**mL**: mililitro

**mm**: milímetro

**mM**: milimolar

**ng**: nanograma

**nm**: nanômetro

**nmol**: nanomolar

**pg**: picograma

**U/mL**: unidade por mililitro

**$\mu$ g**: micrograma

**$\mu$ L**: microlitro

**$\mu$ M**: micro molar

## **LISTA DE FIGURAS**

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Esquema de invasão trofoblástica com obstrução do fluxo sanguíneo. ....                                                                                                                          | 23 |
| <b>Figura 2.</b> Esquema da formação do autolisossoma.....                                                                                                                                                        | 25 |
| <b>Figura 3.</b> Esquema da participação das proteínas beclin-1 e LC3-II no processo da autofagia.....                                                                                                            | 27 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema de cortes dos fragmentos placentários e obtenção dos explantes para cultura.....                                                                                                         | 32 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema da cultura de explantes placentários na ausência ou presença de diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                                          | 33 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema da cultura de explantes placentários na ausência ou presença de diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para determinação dos marcadores de estresse oxidativo.....    | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Representação gráfica das curvas de amplificação da expressão gênica de $\beta$ -actina e GAPDH pela técnica de RT-qPCR.....                                                                     | 38 |
| <b>Figura 8.</b> Representação gráfica da curva de dissociação da $\beta$ -actina e GAPDH por RT-qPCR.....                                                                                                        | 39 |
| <b>Figura 9.</b> Concentração de lactato desidrogenase (LDH) detectada em sobrenadante de cultura de explantes placentários de gestantes normotensas, após 24, 48, 72 e 96 h de cultura.....                      | 40 |
| <b>Figura 10.</b> Concentração de Superóxido dismutase (SOD) detectada em sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas, após 4 h de cultura com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....           | 41 |
| <b>Figura 11.</b> Concentração de catalase detectada em sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas, após 4 h de cultura com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....                             | 42 |
| <b>Figura 12.</b> Concentração de Hsp70 detectada em sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas após 24 h de cultura com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                 | 43 |
| <b>Figura 13.</b> Concentração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) detectada em sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas após 24 h de cultura com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .... | 44 |
| <b>Figura 14.</b> Expressão de RNAm para NLRP3 e caspase-1 em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivados com diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....    | 44 |

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 15.</b> Expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivados com diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... | 45 |
| <b>Figura 16.</b> Expressão de RNAm da citocina anti-inflamatória IL-10 em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivados com diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....                         | 45 |
| <b>Figura 17.</b> Expressão proteica de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivado com diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                              | 46 |
| <b>Figura 18.</b> Expressão proteica de IL-10 em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivado com diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                                     | 47 |
| <b>Figura 19.</b> Expressão de RNAm para LC3-II, beclin-1 e p62 em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivado com diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                   | 48 |
| <b>Figura 20.</b> Esquema de ativação do inflamassoma NLRP3 por meio do estresse oxidativo e sua relação com a autofagia. ....                                                                                                                       | 57 |

## RESUMO

**Introdução:** A gestação é uma condição fisiológica que pode apresentar maior suscetibilidade ao desequilíbrio entre fatores pró e antioxidativos, evoluindo assim com dano celular e resposta inflamatória. A autofagia é um processo que elimina organelas e proteínas danificadas do citoplasma, com potente mecanismo anti-inflamatório responsável pela manutenção da homeostase celular. A autofagia pode controlar a inflamação por meio da inibição da ativação do inflamassoma, complexo essencial para a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Assim, alterações nesses processos podem relacionar-se com disfunções celulares e doenças sistêmicas. **Objetivos:** Este projeto teve como objetivo avaliar se a exposição de explantes placentários a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é capaz de induzir autofagia e levar a ativação do inflamassoma NLRP3. **Métodos:** Explantes placentários de gestantes normais obtidos após o parto foram cultivados em diferentes concentrações de  $H_2O_2$  por 4 e 24 h após a avaliação da viabilidade dos mesmos nesses períodos. As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase foram avaliadas nos sobrenadantes das culturas após 4 h. As expressões gênicas de marcadores de autofagia (LC3-II, beclin-1 e p62), do inflamassoma (NLRP3 e caspase-1) e das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  foram avaliadas por RT-qPCR. Os níveis de gonadotrofina coriônica (hCG), proteína de choque térmico 70 (Hsp70) e citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) após 24 h de cultura. **Resultados:** Os níveis de LDH foram crescentes conforme o tempo de cultura, sendo que as culturas de 24 h apresentaram-se com viabilidade celular adequada para o estudo. Os níveis proteicos de catalase e Hsp70, bem como a expressão gênica de LC3-II, beclin-1 e p62 apresentaram níveis crescentes e relacionados às maiores concentrações de  $H_2O_2$ . As concentrações proteicas de SOD, hCG e TNF- $\alpha$  foram maiores nas culturas com 100  $\mu M$  de  $H_2O_2$ . A expressão gênica de TNF- $\alpha$ ,

IL-1 $\beta$ , NLRP3 e caspase-1 foram elevadas em 1000  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, a expressão proteica de IL-1 $\beta$  também foi maior nessa concentração. As concentrações gênicas e proteicas de IL-10 decresceram de acordo com o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Conclusões:** Os resultados obtidos demonstraram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de induzir o estado de estresse oxidativo placentário, induzir autofagia, ativar o inflamassoma e assim aumentar a produção de citocinas inflamatórias.

**Palavras-chave:** autofagia, citocinas, estresse oxidativo, inflamassoma, placenta.

## ABSTRACT

**Introduction:** Pregnancy is a physiological condition characterized by increased susceptibility to oxidative stress, which can lead to cell damage and inflammatory response. Autophagy is a process that removes damaged organelles and proteins from the cytoplasm. It works as potent anti-inflammatory mechanism, responsible for maintaining cellular homeostasis. Autophagy can control inflammatory responses by regulating the activation of inflammasome, an essential complex for pro-inflammatory cytokine release. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate whether placental explants exposure to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is able to induce autophagy and inflammasome activation. **Methods:** Placental explants achieved from normal pregnant women after delivery were cultured in different concentrations of  $H_2O_2$  for 4 and 24 h after viability evaluation for these periods. Superoxide dismutase (SOD) and catalase were evaluated in culture supernatants after 4 h. Gene expressions of autophagy markers (LC3-II, beclin-1 and p62), inflammasome (NLRP3 and caspase-1) and IL-1 $\beta$ , IL-10 and TNF- $\alpha$  were assessed by RT-qPCR. Levels of chorionic gonadotrophin (hCG), heat shock protein (Hsp70) and IL-1 $\beta$ , IL-10 and TNF- $\alpha$  were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after 24 h of culture. **Results:** LDH levels were increased according to culture time, and the 24 h cultures presented adequate cell viability for the study. The protein levels of catalase and Hsp70, as well as the gene expression of LC3-II, beclin-1 and p62 presented increasing levels and related to the higher concentrations of  $H_2O_2$ . Protein concentrations of SOD, hCG and TNF- $\alpha$  were higher in cultures with 100  $\mu M$  of  $H_2O_2$ . Gene expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NLRP3 and caspase-1 were raised in 1000  $\mu M$  of  $H_2O_2$ . In addition, IL-1 $\beta$  protein expression was also higher at this concentration. Gene and protein concentrations of IL-10 decreased as the  $H_2O_2$  concentration increased. **Conclusions:** Our results demonstrate that  $H_2O_2$  is able to induce a state of placental oxidative

stress, induce autophagy, activate the inflammasome and then increase the production of inflammatory cytokines.

**Key words:** autophagy, cytokines, inflammasome, oxidative stress, placenta.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Estresse Oxidativo e Gestação**

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas como pró-oxidantes, é uma característica do metabolismo celular aeróbico. Entretanto, a produção de fatores pró-oxidantes deve ser controlada e balanceada por fatores antioxidantes, que podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos. Assim, em condições de homeostase celular encontra-se um equilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, sendo que o desequilíbrio em favor do aumento de fatores pró-oxidantes configura o que se denomina estresse oxidativo (Sies, 1991). Este desequilíbrio pode levar à peroxidação lipídica, causar modificações e danos celulares, alterar a produção de proteínas e a própria estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Kalyanaraman, 2013). Do ponto de vista clínico, diversas doenças são associadas com o estresse oxidativo, sendo que os tratamentos com antioxidantes tem sido apontados como promissores desde a década de 90 (Sies, 1991).

A despeito dos processos patológicos relacionados ao estresse oxidativo, é possível também ressaltar sua presença em processos celulares fisiológicos. Sabe-se que o metabolismo oxidativo encontra-se elevado na gestação devido ao aumento progressivo da demanda de oxigênio, tanto pelo feto quanto pela mãe. Este aumento de demanda tem como consequência a maior formação de EROs. Porém, o equilíbrio entre processos pró e antioxidantes é mantido na gestação normal, impedindo-se assim o aumento da liberação de EROs (Kaur et al., 2008).

Alguns antioxidantes são sabidamente produzidos pela placenta, principalmente pelo sinciciotrofoblasto, entre eles a catalase e a superóxido dismutase (SOD), que protegem o tecido placentário das EROs excedentes. Diante desse conceito de proteção, sabe-se que o trofoblasto apresenta função autócrina nesse sentido. Assim, o próprio

desenvolvimento placentário é orquestrado de forma a manter o seu desenvolvimento inicial em ambiente hipóxico até 10-12 semanas de gestação por meio da obstrução das arteríolas espiraladas uterinas (figura 1) (Red-Horse et al., 2004). Assim, é possível observar concentrações de oxigênio em torno de 20 mm Hg ao nível das vilosidades coriônicas nessa fase de desenvolvimento, o que previne a liberação de excesso de radicais  $O_2^-$  na interface materno-fetal.

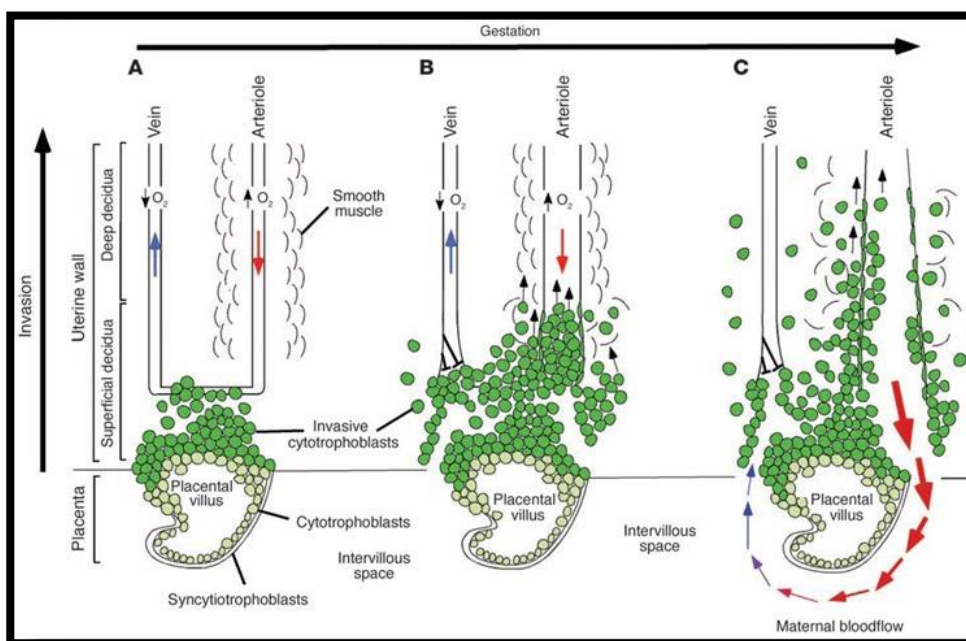


**Figura 1.** Esquema de invasão trofoblástica com obstrução do fluxo sanguíneo, seguido de liberação do fluxo em arteríolas espiraladas. A: início da invasão; B: entre 6 e 8 semanas de idade gestacional; C: entre 10 e 12 semanas de idade gestacional (Red-Horse et al., 2004).

Ao mesmo tempo, observa-se que a capacidade do sincitiotrofoblasto de produzir moléculas antioxidantes torna-se mais proeminente a partir de 10-12 semanas de gestação (Jauniaux et al., 2000; Cindrova-Davis, 2009). Dessa maneira, a proteção mecânica antioxidante promovida pela obstrução das arteríolas espiraladas é um processo fundamental que precisa ocorrer até que o sincitiotrofoblasto se torne apto a secretar as moléculas antioxidantes.

Condições patológicas, caracterizadas por disfunção placentária, podem ser desencadeadas por quebra no equilíbrio entre a produção de EROs e antioxidantes (Burton et al., 2009). Dentre essas condições destaca-se a pré-eclâmpsia (PE), marcada por intensa resposta inflamatória sistêmica e disfunção endotelial. Nessa doença, o tecido placentário é exposto a constantes momentos de hipóxia-reoxigenação devido a anormalidades no desenvolvimento circulatório uterino, culminando com o estresse oxidativo. (Burton et al., 2009; Matsubara et al., 2015).

A relação do estresse oxidativo em tecido placentário de pacientes com PE pode ser demonstrada por meio da expressão da proteína de choque térmico Hsp70, considerada como novo marcador de estresse oxidativo. Essa proteína tem maior expressão em placentas de gestantes com PE em comparação com gestantes normais (Sheikhi et al., 2015). A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é um hormônio que representa o desenvolvimento normal do sinciciotrofoblasto, mas que pode também ser utilizado como marcador de estresse oxidativo nessas células. Kalinderis et al. (2011) demonstraram aumento de hCG no soro de pacientes com PE e sugeriram um possível papel desse hormônio na fisiopatologia da doença. Recentemente, Díaz et al. (2016) demonstraram que a produção de hCG pelo trofoblasto humano é modulada *in vitro* pela tensão de oxigênio (PO<sub>2</sub>) e espécies reativas de oxigênio, corroborando com essa teoria. Porém, é possível que a elevação de hCG seja uma consequência da agressão e tentativa de defesa celular.

É importante entender que a grande fonte de EROs na gestação é a placenta e que o desequilíbrio entre a produção e a capacidade antioxidante desse órgão pode culminar em formas patológicas, entre elas a PE.

## **1.2. Autofagia, Inflamassoma e Gestação**

A autofagia é um processo catabólico conservado evolutivamente,

pelo qual os agregados de proteínas degradadas ou organelas danificadas, tais como o retículo endoplasmático, aparelho de Golgi ou mitocôndrias, são eliminados por meio de processos lisossomais (Yorimitsu & Klionsky, 2007; Krebiehl et al., 2010). A região citoplasmática que contém o material a ser removido é envolvida por uma dupla membrana, formando uma vesícula denominada autofagossoma, o qual se funde ao lisossoma, formando o autolisossoma (figura 2).

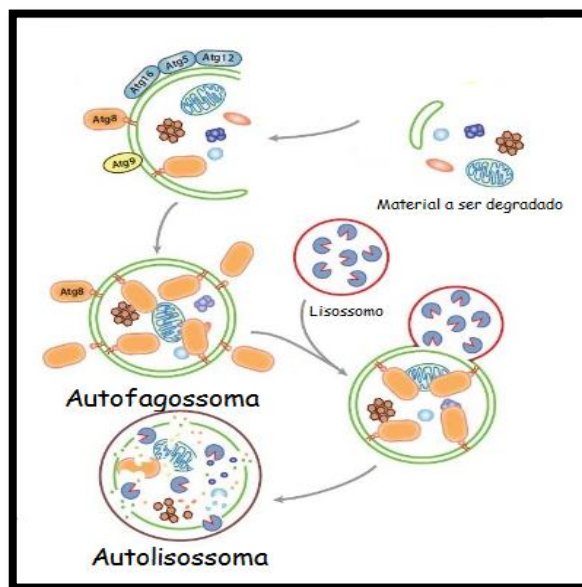


**Figura 2.** Esquema da formação do autolisossoma (adaptado de He & Klionsky, 2009).

Esse complexo degrada o material internalizado e libera os componentes novamente no citoplasma, a fim de fornecer substratos para vias anabólicas e produção de energia (Mizushima, 2009).

A autofagia funciona como um mecanismo de defesa natural e essencial contra doenças inflamatórias, infecciosas, neurodegenerativas e neoplásicas, sendo que a desregulação dessa via está implicada na patogênese de diversas doenças humanas (Mizushima, 2009). Ela é um processo altamente regulado e tem funções importantes no crescimento, desenvolvimento e homeostase celulares, auxilia na manutenção do equilíbrio entre a síntese, degradação e subsequente reciclagem dos

produtos celulares. Além disso, a autofagia é um processo vital na escassez de nutrientes, na presença de estresse oxidativo, degradação de proteínas agregadas e remoção de patógenos. Assim, distúrbios na autofagia têm sido descritos em um número crescente de doenças humanas como a doença de Parkinson, câncer e obesidade (Levine & Kroemer, 2008; Mizushima & Komatsu, 2011).

A deficiência no processo de autofagia ativa a resposta inflamatória e causa dano tecidual. Assim, a autofagia é considerada como um potente mecanismo anti-inflamatório constitutivo (Ravikumar et al., 2010; Levine et al., 2011, Jo et al., 2012). Esse processo é dependente da inibição da proteína-alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) pela hipóxia e privação de nutrientes (Levine et al., 2011). Essa inibição regula a homeostase energética e respostas celulares ao estresse pelo processo autofágico (Dragowska et al., 2011).

Para a ocorrência de autofagia são indispensáveis a proteína beclin-1 e a proteína de cadeia leve LC3-II, pois estas participam da formação do autofagossoma (figura 3) (Shintani & Klionsky, 2004; Levine & Yuan, 2005). Beclin-1 promove o recrutamento de membranas para formar o autofagossoma, enquanto LC3 auxilia no sequestro de proteínas citosólicas e de organelas para dentro do autofagossoma (Yue et al. 2003; Yang et al., 2008; Lamark et al., 2009) (figura 3). Este autofagossoma tem como função capturar o material citosólico, que pode conter organelas danificadas ou proteínas desnaturadas. O autofagossoma funde-se aos lisossomos para formar o autofagolisossoma, de membrana única, e facilitar o processo de degradação e regeneração metabólica, prolongando a sobrevivência celular durante a falta de nutrientes (Kelekar, 2006; Choi & Ryter, 2011). Níveis aumentados da proteína adaptadora p62, que se acumula em células deficientes de autofagia, ativam o fator de transcrição nuclear pró-inflamatório NF- $\kappa$ B por meio de um mecanismo envolvendo oligomerização de fator de associação e a ligação ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) (Moscat & Diaz-Meco, 2009). Sendo

assim, a concentração de p62 no citoplasma é inversamente proporcional à ocorrência da autofagia (Levine et al., 2011).

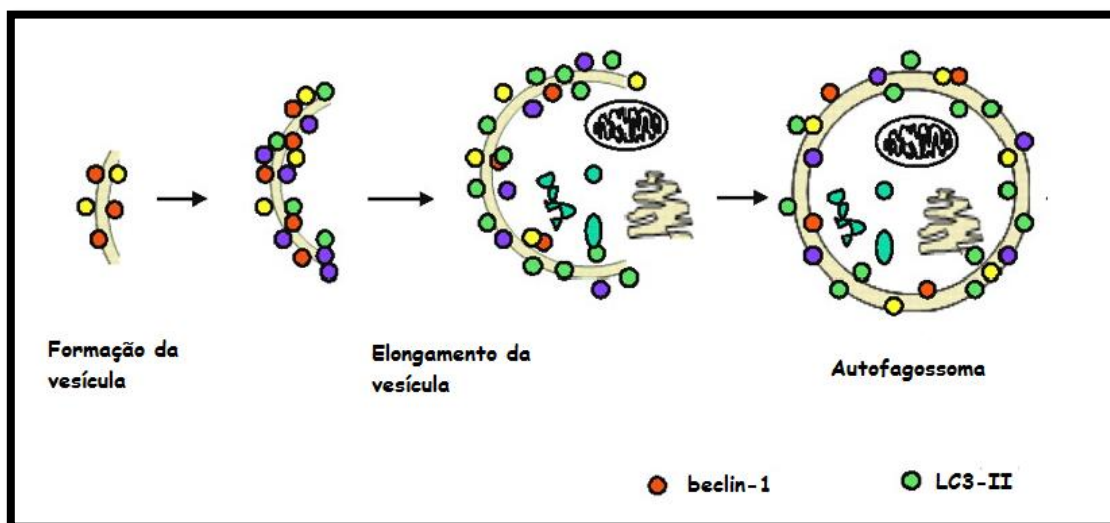


**Figura 3.** Esquema da participação das proteínas beclin-1 e LC3-II no processo da autofagia. (adaptado de Yang et al., 2008).

Estudos sobre autofagia em tecido placentário são escassos, sendo que a maioria dos trabalhos desenvolvidos envolvem linhagens celulares ou culturas de células trofoblásticas para avaliação *in vitro* de autofagia induzida por privação de nutrientes e de oxigênio (Curtis et al., 2013). A indução de hipóxia sobre linhagem de células de coriocarcinoma JEG-3, por exemplo, com o objetivo de explorar o mecanismo regulatório das proteínas envolvidas na autofagia, demonstrou aumento discreto na expressão de LC3-II e diminuição de beclin-1. O tratamento dessas células com fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) induziu aumento significativo na expressão de LC3-II, sem alterar a expressão de beclin-1. Tanto LC3-II quanto beclin-1 estão presentes em vilosidades coriônicas durante a gestação normal e níveis elevados de LC3-II estão presentes em placenta de pacientes com PE grave (Oh et al., 2008). No entanto, em trabalho recente realizado em nosso laboratório avaliamos a expressão gênica e proteica de LC3-II, beclin-1 e mTOR por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) e imunoistoquímica em placenta de gestantes

normais e de portadoras de PE grave. Observamos menor expressão de LC3-II e beclin-1 e maior expressão de mTOR em placentas pré-eclâmplicas, havendo correlação negativa entre as expressões de LC3-II e mTOR (Weel et al., 2016).

Estudos recentes demonstraram maior expressão gênica de mTOR em leucócitos de sangue periférico de pacientes com doenças inflamatórias como osteoartrite (Tchetina et al., 2013) e em mucosa na doença inflamatória intestinal. A ativação de mTOR, associada à menor expressão de LC3-II sugere o papel da via do mTOR sobre a autofagia (Ortiz-Masiá et al., 2014). Portanto, a atividade autofágica diminuída pode estar envolvida na fisiopatologia de gestações complicadas por PE.

A autofagia pode controlar a inflamação por meio da regulação da ativação do inflamassoma, um complexo proteico intracelular, importante para o processamento e liberação de citocinas inflamatórias. A ativação do inflamassoma NLRP3 é importante para a defesa do hospedeiro e eliminação de patógenos como fungos, bactérias e vírus, sendo os produtos de sua ativação, as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18, moléculas protetoras em várias infecções (Dinarello & Fantuzzi, 2003; Dinarello, 2009). O inflamassoma também é ativado em condições de estresse celular ou injúria (Yang et al., 2012). Além disso, algumas evidências indicam que o NLRP3 tem importante papel em doenças inflamatórias como aterosclerose, gota e diabetes tipo I (Dinarello et al., 2010; Grishman et al., 2012; Kingsbury et al., 2011). Entretanto, os diferentes ligantes e o mecanismo exato da ativação do inflamassoma NLRP3 ainda não estão bem esclarecidos (Stroving et al., 2012). Várias moléculas endógenas, consideradas sinais de perigo, tais como cristais de ácido úrico, cristais de colesterol, radicais livres derivados do oxigênio e ácidos graxos, quando em altas concentrações, induzem ativação do inflamassoma NLRP3, desempenhando papel importante em doenças que envolvem respostas inflamatórias (Schroder & Tschopp, 2010; Yang et al. 2012).

Sinais inflamatórios ativam a autofagia que, por sua vez, limita a produção de IL-1 $\beta$  pela destruição do inflamassoma. Uma vez ativada, a autofagia reduz a inflamação enquanto que o seu bloqueio tem um efeito oposto (Shi et al., 2012). Portanto, a autofagia é um mecanismo anti-inflamatório potente que controla a ativação do inflamassoma (Ravikumar et al., 2010; Salminen et al., 2012) e pode representar um mecanismo importante de *feedback* negativo para controlar a secreção de citocinas inflamatórias (Harris, 2013).

Outros sinais de perigo, tais como a presença de Hsp70 e hialurona (HA) podem desempenhar um papel na ativação do inflamassoma, que por sua vez pode levar à formação do autofagossoma. Essas moléculas estão presentes em níveis elevados em soro de pacientes com PE (Peraçoli et al., 2013; Romão et al., 2014).

O conhecimento a respeito do estresse oxidativo e os efeitos do mesmo sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como a relação entre a autofagia e a regulação da ativação do inflamassoma nos fazem pensar na existência de inter-relações entre esses processos na fisiopatologia de problemas obstétricos relacionados com disfunção placentária, como é o caso da PE. Sendo assim, neste estudo aplicamos um modelo *in vitro* de desenvolvimento de estresse oxidativo sobre explantes placentários de gestantes normais com o intuito de avaliarmos nossa hipótese.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre explantes placentários de gestações sem intercorrências e sua relação com os processos de autofagia e ativação do inflamassoma NLRP3.

## **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1.** Monitorar a viabilidade dos explantes placentários para a realização dos experimentos de expressão gênica e proteica para os processos de autofagia e ativação do inflamassoma;
- 2.2.2.** Dosar as enzimas antioxidantes SOD e catalase em sobrenadante de cultura dos explantes placentários estimulados com  $H_2O_2$ ;
- 2.2.3.** Utilizar os explantes placentários cultivados na presença de  $H_2O_2$  para avaliar a expressão gênica dos marcadores de autofagia LC3-II, beclin-1 e p62 e dos genes que codificam as proteínas IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , caspase-1 e NLRP3;
- 2.2.4.** Determinar os níveis proteicos de hCG, Hsp70, IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  em sobrenadante das culturas de explantes cultivados na presença de  $H_2O_2$ .

## **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **3.1. Gestantes**

O grupo de estudo para este projeto foi constituído de 15 gestantes sem patologias clínicas ou obstétricas diagnosticadas, sem antecedentes pessoais para PE e com evolução normal da gravidez. As gestantes incluídas no estudo realizaram o parto na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou por exame ultrassonográfico precoce (<12 semanas de gestação).

### **3.2. Aspectos éticos**

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de

Botucatu – UNESP, parecer nº 1.578.901 (anexos 2 e 3).

### **3.3. Critérios de inclusão**

As placentas utilizadas no estudo foram coletadas de mulheres com gestação única entre 39 e 40 semanas de idade gestacional (gestação a termo), sem doenças clínicas ou obstétricas identificadas e que deram à luz por parto cesáreo eletivo indicado por iteratividade e/ou apresentação pélvica no Serviço de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

### **3.4. Critérios de não-inclusão**

Além de excluir as placentas de mulheres com alterações clínicas e/ou obstétricas diagnosticadas, não foram utilizadas também placentas de gestantes com antecedente de PE ou que apresentavam sinais diretos ou indiretos de processos infecciosos, como espessamento das membranas, alterações na consistência do tecido placentário, odor sugestivo de infecção e/ou presença de secreção purulenta.

### **3.5. Cálculo do tamanho amostral**

O tamanho amostral foi calculado considerando-se os valores de IL-10 obtidos em homogenato de placenta de gestantes normotensas avaliado em trabalho anterior (Weel et al., 2016). Considerando uma confiabilidade de 95%, poder de 90% e margem de erro de 5%, o tamanho amostral mínimo foi de 15 placentas de gestantes normotensas.

### **3.6. Coleta das placentas**

Após o parto cesáreo, as placentas foram examinadas macroscopicamente com intuito de se identificar a presença de coágulos, áreas de calcificação visíveis ou alterações sugestivas de processos infecciosos, como odor acentuado e alterações na consistência do tecido placentário. As placentas que não apresentaram nenhuma das alterações

acima foram selecionadas para o estudo.

Assim, fragmentos de aproximadamente 5 x 5 cm foram imediatamente retirados da região central da placenta, constituindo amostras do citotrofoblasto viloso e da região do sinciciotrofoblasto em contato com a face materna (placa basal) (figura 4). Após a coleta, o tecido trofoblástico foi lavado em solução salina tamponada (PBS) e separado da camada decidual que normalmente se encontra aderida à placa basal. As porções terminais das vilosidades foram evidenciadas em PBS e as vilosidades foram identificadas por meio de sua coloração rósea e por flutuarem livremente no líquido assumindo aspecto arboriforme. Essas porções foram dissecadas em pequenos seguimentos para constituírem os explantes placentários.

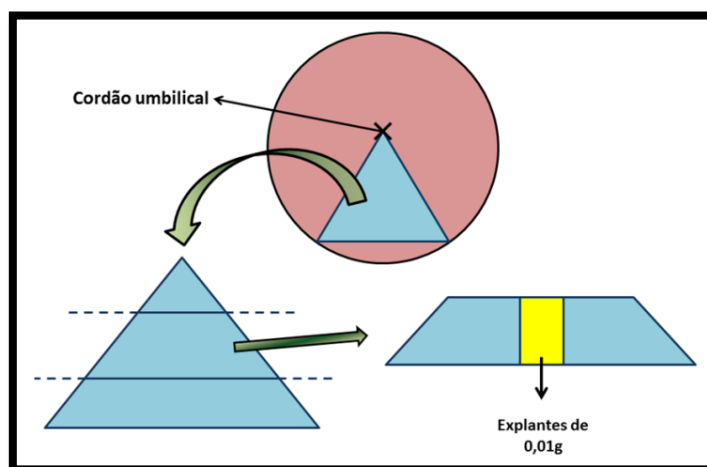


**Figura 4.** Esquema de cortes dos fragmentos placentários e obtenção dos explantes para cultura.

### **3.7. Cultura de explantes placentários na presença de peróxido de hidrogênio**

A cultura de explantes foi realizada segundo a figura 5. A quantidade de vilos utilizada foi de 11 mg de tecido placentário por poço e o cultivo foi realizado em placas de 24 poços (SPL Life Sciences, Coréia) por 24h para a estabilização da cultura (Yu et. al, 2012). As culturas foram realizadas na ausência de  $H_2O_2$  (cultura controle) ou na presença de 10, 100 e 1000

$\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  por 4 e 24 h, em meio de cultura sintético RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA), 40  $\mu\text{g/mL}$  de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL Life Technologies, Holanda) inativado (meio RPMI completo).

Após os períodos de cultura, os explantes foram removidos e submetidos à extração de ácido ribonucleico (RNA) para posterior análise de expressão de gênica. Os sobrenadantes das culturas foram obtidos, centrifugados a 2000  $g$  por 10 min e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  para determinação dos marcadores de estresse oxidativo e de citocinas por meio de kits disponíveis comercialmente.

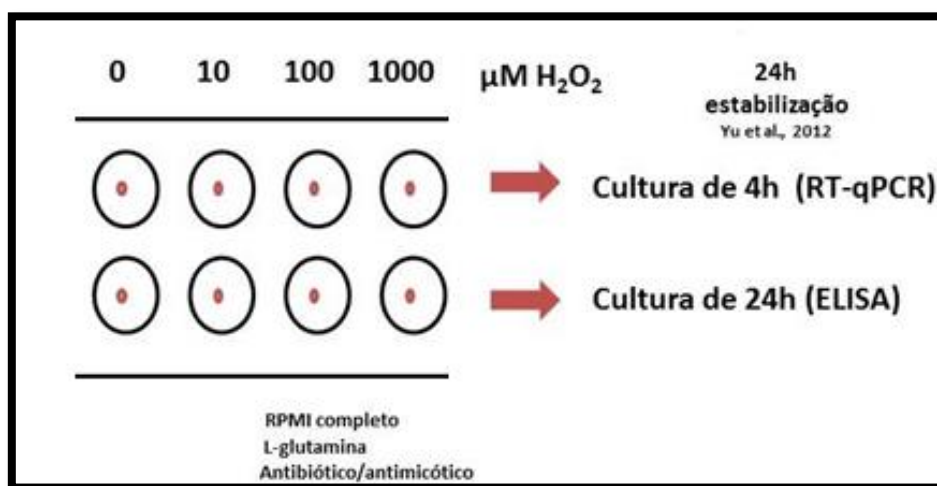


**Figura 5.** Esquema da cultura de explantes placentários na ausência ou presença de diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.8. Análise da viabilidade celular dos explantes placentários

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) nos sobrenadantes dos explantes placentários após 24, 48, 72 e 96 h foi utilizada como um indicador de viabilidade celular e foi determinada por meio de kit comercial (Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.9. Marcadores de estresse oxidativo

As determinações dos marcadores de estresse oxidativo foram realizadas de acordo com a figura 6. Para determinação de SOD e Catalase em sobrenadante das culturas de explantes placentários após 4 h foram utilizados kits comerciais (Cayman Chemical Company, EUA) e as reações foram desenvolvidas de acordo com as instruções do fabricante.

As determinações de Hsp70 e hCG nos sobrenadantes das culturas de tecido placentário após 24 h foram realizadas empregando-se kits comerciais (R&D Systems, EUA – Hsp70; Sigma Aldrich - hCG ), de acordo com as instruções dos fabricantes. Os limites de sensibilidade desses kits foram: SOD: 0,005 U/mL; catalase: 2 nmol/min/mL; Hsp70: 125 pg/mL; hCG: 50 pg/mL.

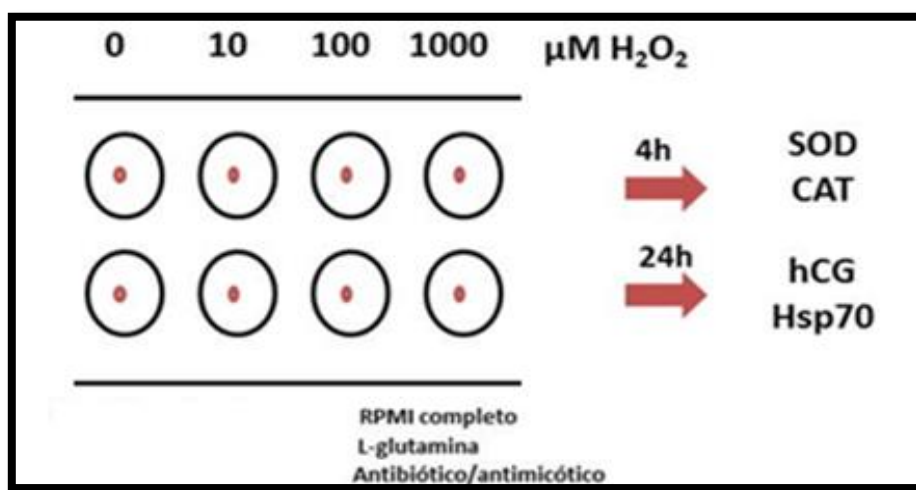


**Figura 6.** Esquema da cultura de explantes placentários na ausência ou presença de diferentes concentrações de  $H_2O_2$  para determinação dos marcadores de estresse oxidativo.

### 3.10. Avaliação da expressão de transcritos relacionados à inflamação e autofagia

Os explantes placentários foram submetidos à análise das expressões, em nível transcricional, dos genes que codificam as proteínas IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , LC3-II, beclin-1 e p62. Além disso, foram avaliadas a

expressões gênicas de NLRP3 e caspase-1, relacionadas com a ativação do inflamassoma. O RNA total foi extraído por meio do sistema *Total RNA Purification Kit* (Norgen Biotek Corp., Canadá), conforme protocolo do fabricante. Após a extração, a fim de garantir a completa remoção de DNA genômico, 1µg de RNA total foi incubado com DNase I Amp Grade (Invitrogen®, EUA). A pureza e a qualidade relativa de todas as amostras de RNA total obtidas foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop®2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™, EUA). Posteriormente, a síntese de DNA complementar (DNAC) para execução da Reação em Cadeia da Polimerase acoplada a transcrição reversa (Reverse Transcription-coupled Polymerase Chain Reaction– RT-PCR) foi realizada com 450 ng de RNA total por 60 µL de reação, utilizando ImProm-II™ Reverse Transcription System, conforme protocolo do fabricante.

As quantificações das expressões gênicas de IL-1β, IL-10, TNF-α, LC3-II, beclin-1 e p62 foram efetuadas por meio da técnica RT-qPCR utilizando GoTaq®qPCR Master Mix (Promega, EUA). O aparelho utilizado foi o 7500 real-time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA).

As diversas variantes dos alvos estudados foram alinhadas no programa MEGA 6 e, posteriormente, cada iniciador foi escolhido por meio do programa Primer-BLAST. Para cada alvo, foram selecionados dois iniciadores, sendo que alguns estão localizados na junção éxon-éxon. Iniciadores presentes em tal junção garantem a pureza da reação, ou seja, a ausência de qualquer DNA genômico que possa contaminá-la. As sequências dos iniciadores utilizados no presente estudo estão detalhadas no quadro 1.

**Quadro 1** - Sequências dos iniciadores para a análise das expressões dos genes caspase-1, NLRP3, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, p62, beclin-1, LC3-II, GAPDH e  $\beta$ -actina.

| Alvo                              | Sequência (5'-3')                                                                                             | Comprimento do produto | Nome do gene | Acesso ao GenBank           |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------|-----------------------------|
| Caspase-1                         | Forward primer:<br>(1065)AGACATCCCACAATGGGCTC(1084)<br>Reverse primer:<br>(1172)TGAAATCGAACCTTGCAGGAAA(1151)  | 108pb                  | CASP1        | <a href="#">NM_033292.3</a> |
| NLRP3                             | Forward primer:<br>(2826)GAGGAAAAGGAAGGCCGACA(2845)<br>Reverse primer:<br>(2917)TGGCTGTTACCAATCCATGA(2897)    | 92pb                   | NLRP3        | <a href="#">NM_004895.4</a> |
| IL-1 $\beta$                      | Forward primer:<br>(544)GAGCAACAAGTGGTGTCTCC(564)<br>Reverse primer:<br>(653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)        | 110 pb                 | IL1B         | <a href="#">NM_000576.2</a> |
| TNF- $\alpha$                     | Forward primer:<br>(325)GCTGCACCTTTGGAGTGATCG(344)<br>Reverse primer:<br>(462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)       | 138 pb                 | TNF          | <a href="#">NM_000594.3</a> |
| IL-10                             | Forward primer:<br>(361)AAGACCCAGACATCAAGGCG(380)<br>Reverse primer:<br>(445)ATTCGATGACAGCGCCGTAG(426)        | 85 pb                  | IL10         | <a href="#">NM_000572.2</a> |
| p62                               | Forward primer:<br>(159)CGCTTCAGCTTCTGCTGC(176)<br>Reverse primer:<br>(308)GTCCTCATCGCGGTAGTGC(290)           | 150 pb                 | SQSTM1       | <a href="#">NM_003900.4</a> |
| Beclin-1                          | Forward primer:<br>(101)GTAGACCGACTTGGGTGAC(120)<br>Reverse primer:<br>(198)CATGGTGCTGTTGTTGGACG(179)         | 98 pb                  | BECN1        | <a href="#">NM_003766.3</a> |
| LC3-II                            | Forward primer:<br>(517)CCAGGAAACCTTCGGCTTCT(536)<br>Reverse primer:<br>(632)CGGTAGAGGCAGCTCAGTTC(613)        | 116 pb                 | MP1LC3A      | <a href="#">NM_032514.3</a> |
| <b>CONTROLE INTERNO DA REAÇÃO</b> |                                                                                                               |                        |              |                             |
| GAPDH                             | Forward primer:<br>(684)CGTGAAGGACTCATGACCA(703)<br>Reverse primer:<br>(801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)         | 11 8pb                 | GAPDH        | <a href="#">NM_002046.4</a> |
| $\beta$ -actina                   | Forward primer:<br>(1061)AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT(1083)<br>Reverse primer:<br>(1180)CGGACTCGTCATACTCCTGC(1161) | 120 pb                 | ACTB         | <a href="#">NM_001101.3</a> |

Cada reação foi definida em duplicata no total de 20  $\mu$ L cada, o qual contém 0,3  $\mu$ M de cada iniciador (sense e anti-sense), 2  $\mu$ L de DNAC, 10  $\mu$ L de master mix e 6,8  $\mu$ L de água livre de nuclease. Adicionalmente, foi inserido um controle, também em duplicata, o qual foi incluído em cada reação a fim de provar que não há contaminação. As condições para a reação de RT-qPCR foram: denaturação inicial a 96°C - 10 min, 40 ciclos a 95°C – 15 s e 60°C – 60 s, seguido de uma curva *melting*. A amplificação de cada transcrito específico foi confirmada pelo perfil da curva *melting* gerada no final de cada reação.

Os valores de expressão dos transcritos analisados foram normalizados com base na análise concomitante da expressão do gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e do gene da  $\beta$ -actina. O cálculo da expressão diferencial dos genes selecionados foi efetuado pelo método de processamento de dados em relação a uma curva padrão (Larionov et al., 2005).

Todas as condições, inclusive o GAPDH de cada amostra e o controle negativo da reação (*No template Control* – NTC; sem DNA) foram analisadas em duplicatas. Para análise da expressão relativa, amostras de RNA obtidas de explantes placentários de gestantes do grupo controle (na ausência de  $H_2O_2$ ) foram reunidas e após as análises da expressão gênica, essa amostra recebeu o valor relativo de 100 para a normalização. Todas as outras amostras receberam valores relativos a essa amostra.

### **3.11. Padronização da escolha do normalizador utilizado na técnica de RT-qPCR**

O RNA mensageiro extraído de fragmentos placentários de gestantes normotensas (n=4) foi utilizado para a padronização da técnica de RT-qPCR. As figuras 7A e 7B representam as curvas de amplificação do gene da  $\beta$ -actina e do GAPDH, respectivamente. Pode-se observar que as curvas de amplificação da  $\beta$ -actina (figura 7A) apresentaram maior diferença entre seus *cycle thresholds* (Cts) do que a diferença observada para as curvas do GAPDH (figura 7B). Portanto, para normalização das reações de RT-qPCR, foi utilizado o GAPDH, o qual demonstrou maior uniformidade de amplificação.

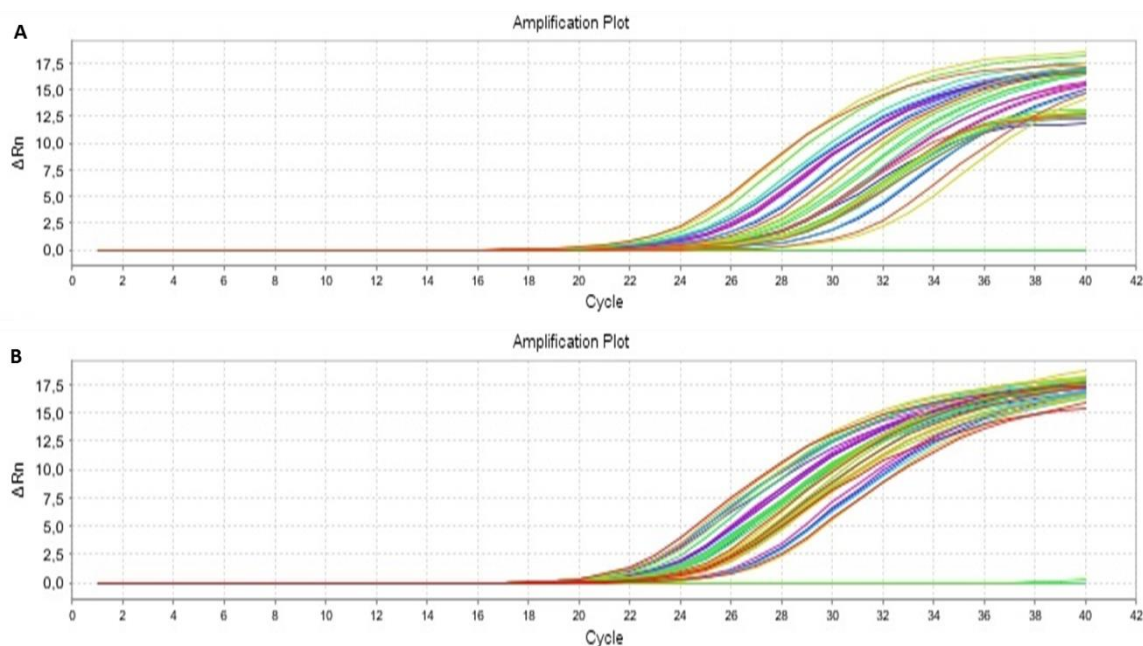


**Figura 7.** Representação gráfica das curvas de amplificação da expressão gênica de  $\beta$ -actina (A) e GAPDH (B) de fragmentos placentários(n=4) pela técnica de RT-qPCR.

A curva de dissociação mede a temperatura de dissociação dos produtos amplificados e deve conter apenas um pico, indicando ausência de produtos inespecíficos na reação, assim como dímeros de *primers* (iniciadores) que podem ser identificados como amplificação, já que formam estruturas de dupla-fita, permitindo a incorporação do marcador fluorescente SYBR Green. As reações apresentaram pico único de curva de dissociação para cada amostra, comprovando a especificidade da reação (figura 8). Novamente, o emprego do GAPDH (figura 8B) confirma a escolha desse normalizador para a técnica de RT-qPCR.

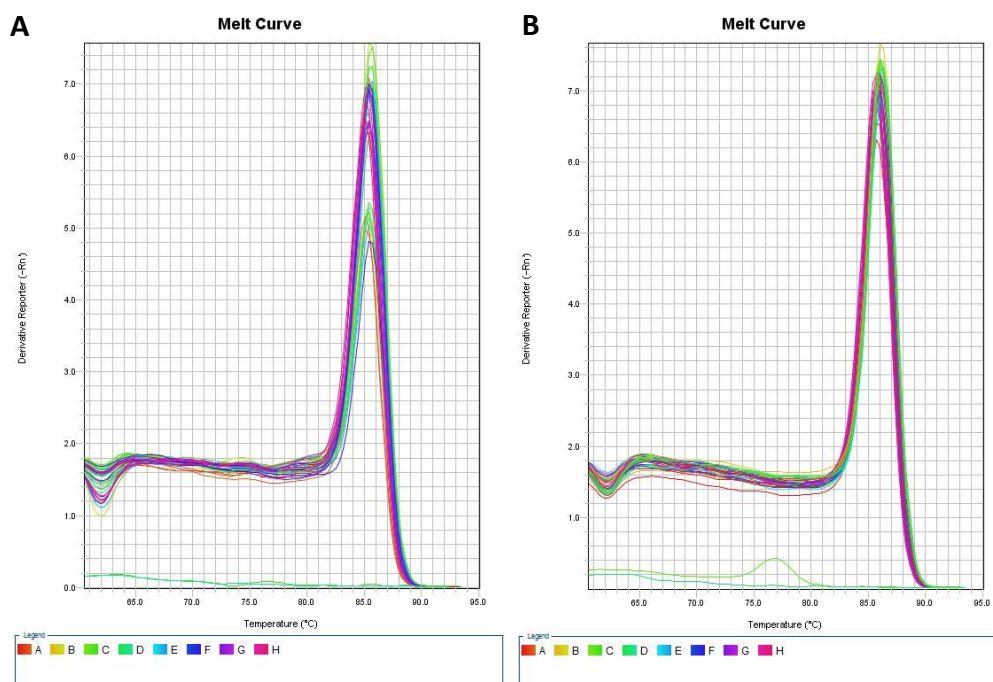


**Figura 8.** Representação gráfica da curva de dissociação da  $\beta$ -actina (A) e GAPDH (B) em fragmentos placentários de gestantes normotensas ( $n=4$ ) por RT-qPCR.

### 3.12. Determinação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ em sobrenadantes de culturas de explantes placentários

Para as quantificações das citocinas nos sobrenadantes das culturas após 24 h, foi empregado o ensaio ELISA (R&D Systems). As reações foram desenvolvidas segundo as instruções do fabricante.

As concentrações das proteínas no sobrenadante da cultura após 24 h foram calculadas a partir das curvas-padrão realizadas. Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonais e policlonais, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas-padrão, foram aquelas recomendadas pelo fabricante (R&D Systems).

Os limites de sensibilidade desses kits foram de: IL-10: 3,9 pg/mL; IL-1 $\beta$ : 3,9 pg/mL; TNF- $\alpha$ : 1,6 pg/mL.

### 3.13. Análise estatística

Os resultados foram avaliados empregando-se o teste de análise de variância (ANOVA), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey, segundo o programa estatístico PRISM, (Graph Prism for Windows, version 6.01, GraphPad, EUA). O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinação da enzima lactato desidrogenase em cultura de explantes placentários

O resultado da dosagem da enzima LDH no sobrenadante de explantes placentários está representado na figura 9. Foi observado aumento na produção dessa enzima de acordo com o tempo de cultura (24, 48, 72 e 96 h), sendo que a maior concentração de LDH foi observada no tempo de 96 h.

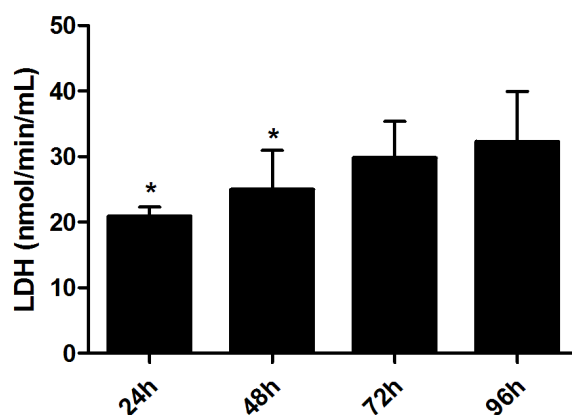


**Figura 9.** Concentração de lactato desidrogenase (LDH) detectada em sobrenadante de cultura de explantes placentários de gestantes normotensas, após 24, 48, 72 e 96 h de cultura. Resultados expressos em média  $\pm$  SD.\* ( $p < 0,05$ ) vs 96 h. (ANOVA)

## 4.2. Determinação dos marcadores de estresse oxidativo

### 4.2.1. Superóxido dismutase

Os resultados da dosagem de SOD no sobrenadante de cultura de explantes placentários de gestantes normotensas estimulados com diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  estão representados na figura 10. Observaram-se concentrações crescentes de SOD diante da exposição do tecido placentário a diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entretanto, esse aumento ocorreu até a cultura com 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com diferença estatística para a cultura não estimulada. Na cultura realizada com 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  observou-se queda na liberação de SOD.

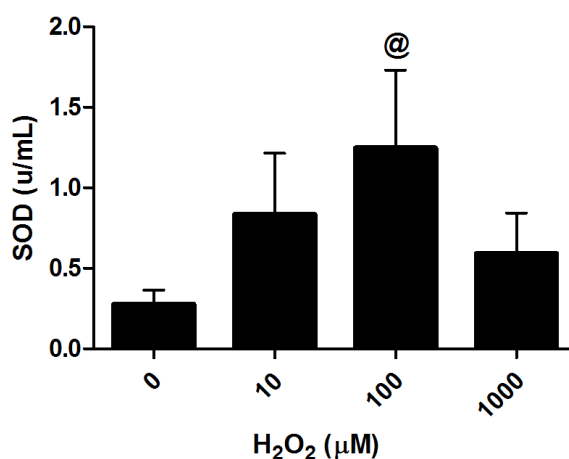


**Figura 10.** Concentração de Superóxido dismutase (SOD) detectada em sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas, após 4 h de cultura com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Resultados expressos em média  $\pm$  SD. @ ( $p < 0,05$ ) vs 0. (ANOVA)

### 4.2.2. Catalase

Na figura 11, estão representados os resultados da dosagem da enzima catalase no sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas após 4 h de cultura com diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As concentrações de catalase foram visivelmente crescentes ao longo da

exposição do tecido placentário às diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo os maiores níveis observados na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com diferença significativa em relação à cultura não estimulada com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

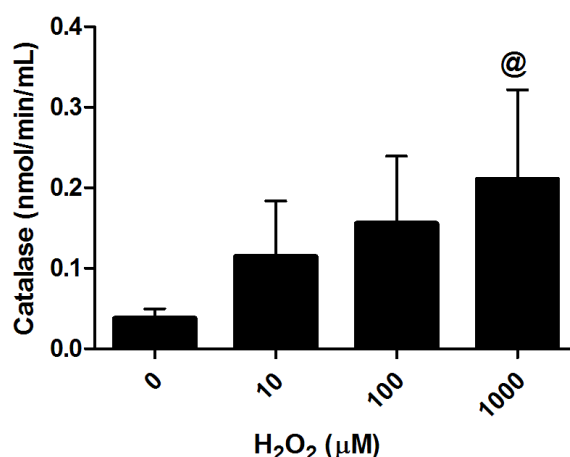


**Figura 11.** Concentração de catalase detectada em sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas, após 4 h de cultura com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Resultados expressos em média  $\pm$  SD. @ ( $p < 0,05$ ) vs 0. (ANOVA)

#### 4.2.3. Hsp70

Os resultados da dosagem de Hsp70 nos sobrenadantes de explantes placentários de gestantes normotensas estão representados na figura 12. Os níveis proteicos de Hsp70 elevaram-se em função do aumento da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com diferença significativa para o controle em relação às culturas com maior concentração (100 e 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

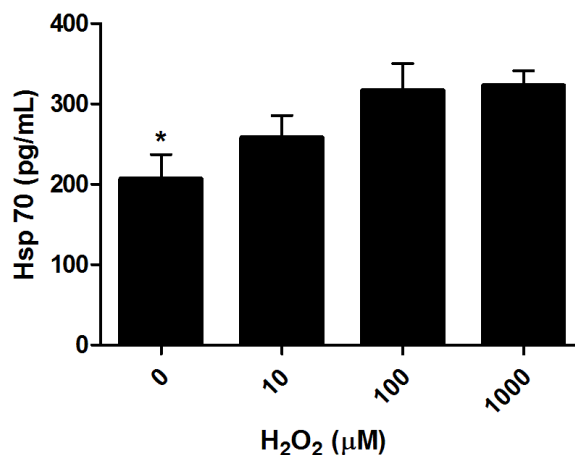


**Figura 12.** Concentração de Hsp70 detectada em sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas após 24 h de cultura com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resultados expressos em média ± SD.\* ( $p < 0,05$ ) vs 100, 1000 µM. (ANOVA)

#### 4.2.4. Gonadotrofina coriônica

Os resultados da dosagem de hCG no sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas estão representados na figura 13. Os níveis proteicos de hCG, liberados pelo tecido placentário frente às diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevaram-se até a exposição de 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com diferença estatística para as cultura não estimulada e com 10 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, houve redução dos níveis de hCG.

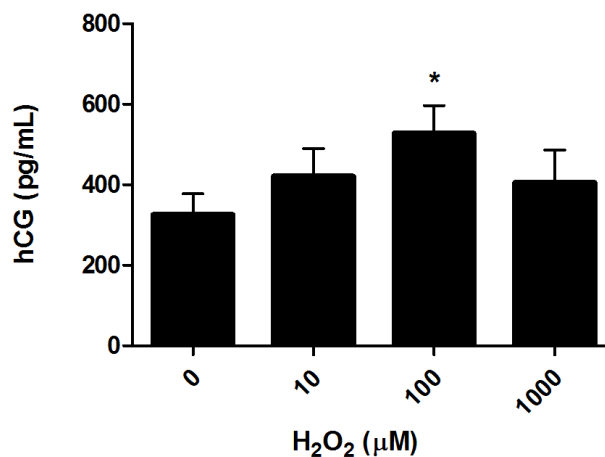


**Figura 13.** Concentração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) detectada em sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas após 24 h de cultura com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resultados expressos em média  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs 0 e 10  $\mu$ M. (ANOVA)

#### 4.3. Expressão gênica de NLRP3 e caspase-1

A figura 14 mostra que a expressão gênica de NLRP3 e de caspase-1 foi crescente e maior na concentração de 1000  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com diferença estatística para a concentração de 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e para a cultura não estimulada. Esses resultados mostram que a concentração de 1000  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziu a ativação do inflamassoma NLRP3.

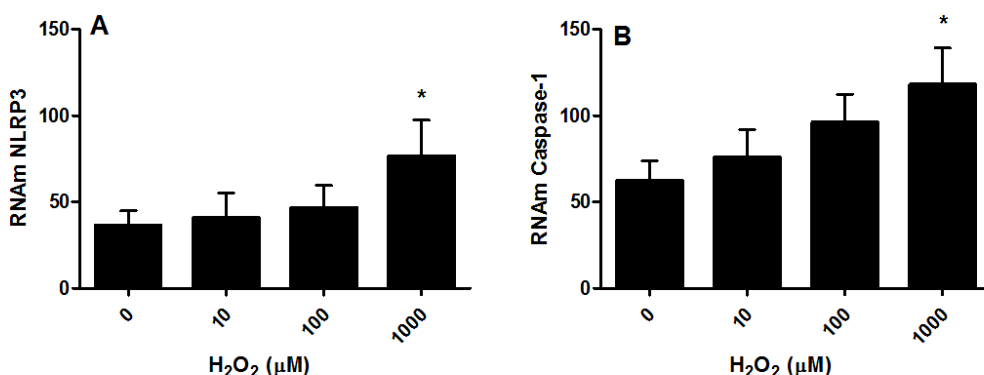


**Figura 14.** Expressão de RNAm para NLRP3 (A) e caspase-1 (B) em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivados com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resultados expressos em média  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs 0, 10  $\mu$ M. (ANOVA)

#### 4.4. Expressão gênica das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10

A expressão gênica de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi maior nos explantes cultivados nas concentrações de 100 e 1000  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com diferença para a cultura sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0). (figura 15). Nota-se que a concentração de 1000  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou maior expressão gênica.

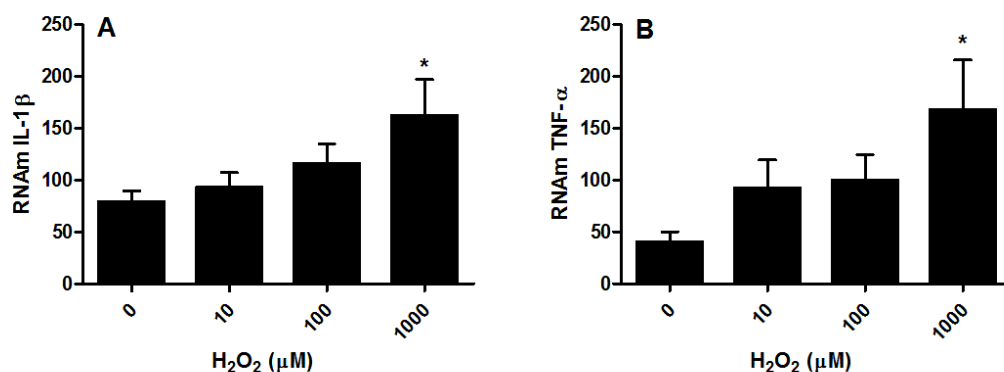


**Figura 15.** Expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivados com diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . Resultados expressos em média  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs 0. (ANOVA)

A expressão gênica da citocina IL-10 em explantes placentários de gestantes normotensas está representada na figura 16. Nota-se um decréscimo na expressão gênica dessa citocina conforme o aumento da concentração de  $H_2O_2$ .

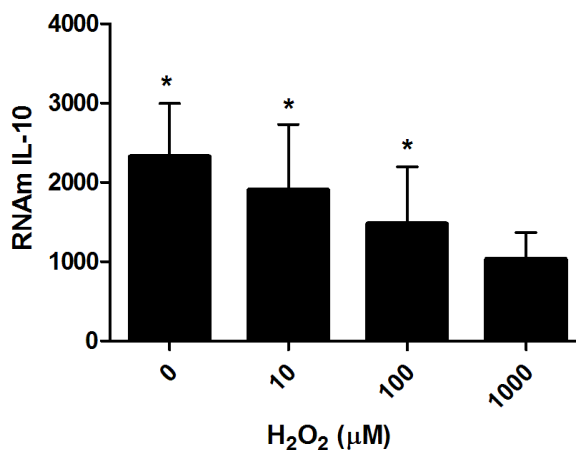


**Figura 16.** Expressão de RNAm da citocina anti-inflamatória IL-10 em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivados com diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . Resultados expressos em média  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs 1000  $\mu M$ . (ANOVA)

#### 4.5. Determinação de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 pela técnica de ELISA

Os resultados da dosagem das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas estão representados na figura 17. A expressão proteica dessas citocinas foi maior nos explantes cultivados nas concentrações de 100 e 1000  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com diferença para a cultura sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0) e para a cultura com 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A expressão proteica de IL-1 $\beta$ , maior em 1000  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentou diferença estatística para a cultura de 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

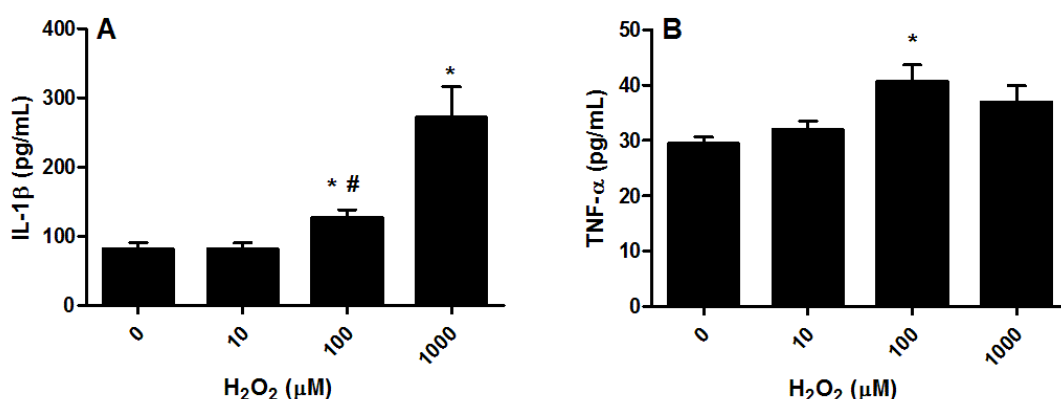


**Figura 17.** Expressão proteica de IL-1 $\beta$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivado com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resultados expressos em média  $\pm$  SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs 0, 10  $\mu$ M; # ( $p < 0,05$ ) vs 1000  $\mu$ M.

Os resultados da dosagem da citocina IL-10 no sobrenadante de explantes placentários de gestantes normotensas estão representados na figura 18. Em concordância com a expressão gênica, houve um decréscimo na expressão proteica dessa citocina anti-inflamatória em função do aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

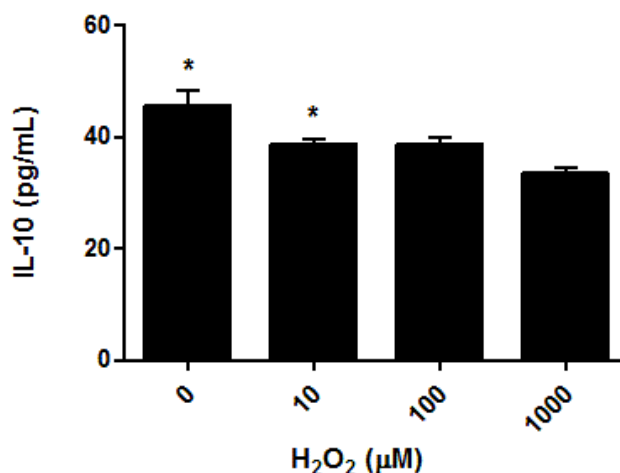


**Figura 18.** Expressão proteica de IL-10 em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivado com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resultados expressos em média ± SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs 1000 μM. (ANOVA)

#### 4.6. Análise da expressão ao nível transcricional de LC3-II, beclin-1 e p62

A expressão gênica de LC3-II, beclin-1 e p62 está representada na figura 19. Nesse trabalho observa-se que a expressão gênica de LC3-II está aumentada em tecidos expostos à concentração de 1000 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparadas ao grupo não estimulado (0), o que significa que a autofagia está mais ativada nesses grupos, em resposta à perturbação gerada pelo estresse oxidativo.

A expressão gênica de beclin-1 e p62 aumentou em função da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tendo seu valor máximo na concentração de 1000 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com diferença estatística quando comparada ao grupo não estimulado (0).

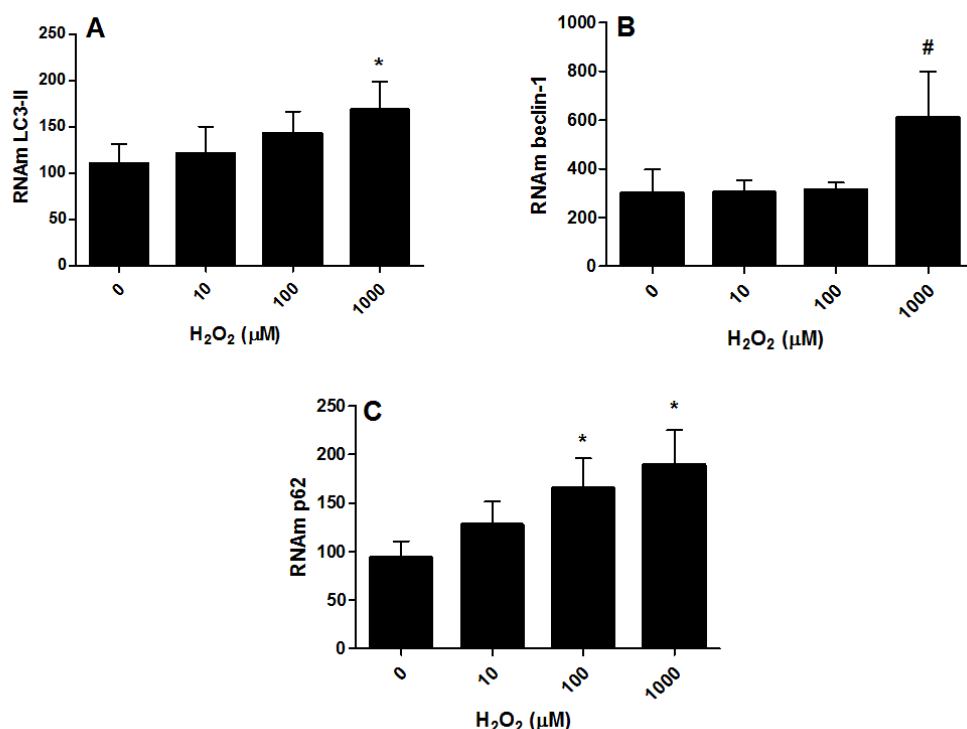


**Figura 19.** Expressão de RNA<sup>Am</sup> para LC3-II (A), beclin-1 (B) e p62 (C) em explantes de tecido placentário obtido de gestantes normotensas e cultivado com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resultados expressos em média ± SD. \* ( $p < 0,05$ ) vs 0; # ( $p < 0,05$ ) vs 0, 10, 100 µM. (ANOVA)

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito do estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a ocorrência de autofagia e ativação do inflamassoma em explantes de placentas de mulheres gestantes de termo (39 – 40 semanas), sem alterações clínicas ou obstétricas identificadas e submetidas a parto cesáreo eletivo. Em nossa metodologia visamos reproduzir experimentalmente a fisiopatologia das complicações obstétricas relacionadas à disfunção placentária provocada por alterações circulatórias uterinas. Essas alterações são responsáveis pelo estabelecimento do fenômeno de hipóxia-reoxigenação e consequente produção de EROs. Entre as complicações obstétricas relacionadas com essa fisiopatologia, a PE, com ou sem restrição de crescimento fetal

associada, é sem dúvida a mais estudada. Portanto, assumimos que apesar de nosso estudo não se referir explicitamente sobre PE, traz em seu contexto a preocupação com essa doença, responsável por cerca de 80.000 mortes maternas e 500.000 mortes perinatais em todo o mundo (Duley, 2009).

Para os experimentos com explantes placentários, primeiramente foram padronizados o tempo de cultura e o limite tóxico da concentração de  $H_2O_2$ . Tais passos são fundamentais em experimentos desse tipo. A avaliação de viabilidade celular foi realizada a partir da identificação da atividade de LDH. Essa enzima, presente em todas as células do organismo, catalisa a oxidação de lactato para piruvato, sendo que sua liberação ocorre rapidamente em meios de culturas celulares quando há dano na membrana plasmática, podendo ser considerada por isso como um marcador de viabilidade (Díaz et al., 2016).

Os resultados da liberação de LDH obtidos nos sobrenadantes de culturas dos explantes placentários em diferentes tempos deram suporte à metodologia utilizada, permitindo identificar o melhor tempo de cultura a ser utilizado para a dosagem de marcadores e expressões gênicas relacionados à inflamação, autofagia e ativação do inflamassoma. A baixa atividade de LDH na cultura de 24h indicou que as células estavam viáveis para a realização dos experimentos nesse tempo de cultura.

A associação entre modelos experimentais e o que se observa na clínica é algo sempre desejado. Tsoi et al. (2001) demonstraram maior expressão gênica de LDH e maior atividade dessa enzima em placentas de pacientes com PE. Dessa forma, a atividade dessa enzima foi considerada como marcador em algumas complicações da gestação relacionadas a alterações placentárias. Tjoa et al. (2006) demonstraram aumento da LDH em tecido placentário submetido a hipóxia-reoxigenação e sugeriram a ligação entre o estresse oxidativo e morte celular por apoptose.

Em nosso estudo, a produção de SOD e hCG apresentaram perfis

semelhantes entre si e com maior atividade na cultura tratada com 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , havendo diminuição na cultura com 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esse resultado pode ser explicado por um esgotamento celular na produção de antioxidantes, causando queda importante nas concentrações de SOD.

Níveis diminuídos de SOD têm sido associados a complicações na gravidez, sendo que a redução da atividade da SOD foi demonstrada em placentas de pacientes com PE (Vanderlelie et al., 2005). De maneira interessante, suplementações com antioxidantes previamente ou durante a gestação não se mostraram efetivas na prevenção de complicações relacionadas ao estresse oxidativo, o que eleva a importância de se avaliar a capacidade intrínseca de produção de antioxidantes pelos tecidos envolvidos nessas complicações, como é o caso do tecido placentário (Duhig et al., 2016; Wu et al., 2015).

A atividade aumentada da SOD durante a gravidez se dá pela necessidade do tecido placentário, principalmente do sinciotrofoblasto de se defender para combater a geração de EROs, que pode ser exacerbada na interface materno-fetal, principalmente frente a modificações ineficientes da circulação útero placentária (Burton & Jauniaux, 2004). A ação antioxidante do tecido placentário é vista então, como fundamental para a prevenção do estresse oxidativo e o sucesso da gestação (Perkins, 2006). A regulação autócrina/parácrina e a renovação do sinciotrofoblasto são influenciadas pelo equilíbrio entre ação oxidativa e antioxidante placentária. A secreção de hCG pelo sinciotrofoblasto, que se apresenta como marcador de sua função, é modulada *in vitro* pela tensão de oxigênio e por EROs (Alsat et al., 1996; Weedon-Fekjaer & Taskén, 2011; Díaz et al., 2016). Kharfi et al. (2005) demonstraram correlação positiva entre hCG e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na circulação materna, sugerindo haver correlação positiva entre estresse oxidativo e secreção de hCG. Kharfi-Aris et al. (2006) demonstraram que os níveis de hCG foram proporcionais às concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  até 50  $\mu\text{M}$ . Após essa concentração ocorreu queda na produção de hCG. Nossos resultados

corroboram com esses autores, já que a produção de hCG foi máxima até 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com diminuição dos níveis desse hormônio nas concentrações mais elevadas.

A catalase é outra enzima antioxidante que confere proteção celular em casos de estresse oxidativo. Muitos autores têm estudado o papel da catalase em amostras de placenta de gestantes normais e de gestantes com PE (Gohil et al., 2011; Yan & Xu, 2012; Wiktor & Kankofer, 2001). Os resultados obtidos ainda são inconsistentes, havendo estudos que demonstram diminuição da atividade da catalase em gestações complicadas por PE, enquanto outros apontam aumento da atividade dessa enzima.

Em nossos experimentos, os níveis elevados de catalase podem ter sido responsáveis pela manutenção da viabilidade celular frente ao efeito deletério provocado pelo estresse oxidativo.

A membrana celular é permeável à catalase. Assim, esta pode ser uma enzima-chave para a prevenção de condições de estresse oxidativo. De fato, a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela catalase é extremamente rápida (Hempstock et al., 2003).

A atividade da Hsp70 foi semelhante à da catalase, crescente e maior na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Uma vez que a Hsp70 possui funções na recuperação celular frente ao estresse e contra injúrias (Fulda et al., 2010), essa proteína de choque térmico é também considerada um marcador de estresse oxidativo (Birnbbaum, 1995; Barut et al., 2010). A Hsp70 se liga a receptores de superfície, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-6}$  (Asea et al., 2002; Asea, 2005). O controle dos níveis dessa proteína tem papel importante na manutenção da viabilidade celular em casos de complicações da gestação que envolvem alterações placentárias (Padmini & Lavanya, 2011). De acordo com Molvarec et al. (2009), altos níveis de Hsp70 encontrados no soro de gestantes com PE correlacionam-se com a inflamação sistêmica, estresse oxidativo e injúria hepatocelular

característicos dos casos graves da doença. Sheikhi et al. (2015) demonstraram, por análise imunoistoquímica, maior expressão de Hsp70 em placentas de gestantes com PE em comparação com gestantes normotensas. Ademais, dados recentes tem comprovado a conexão entre inflamação e estresse oxidativo na forma de um ciclo vicioso capaz de propagar a resposta inflamatória (Lugrin et al., 2014). Tais constatações tem ressaltado o papel das EROs na regulação do inflamassoma NLRP3 (Haneklaus et al., 2013).

Em nosso estudo demonstramos que a expressão gênica de NLRP3 e caspase-1 possuem perfis semelhantes entre si e apresentaram maior expressão em culturas expostas à concentração de 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o que significa que essa concentração foi capaz de ativar o inflamassoma NLRP3.

Em trabalho recente, Mulla et al. (2011) demonstraram que o ácido úrico ativa o inflamassoma em células trofoblásticas, resultando no processamento e secreção de IL-1 $\beta$ , sugerindo ser este, um novo mecanismo para a indução da inflamação na interface materno-fetal e ocasionando resultados adversos na gestação, incluindo a PE.

Além do ácido úrico, outros padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) são capazes de ativar o inflamassoma. Bauernfeind et al. (2009) sugeriram em seus estudos que as EROs podem estar envolvidas no primeiro passo da ativação do inflamassoma NLRP3, a partir de efeito sobre o NF- $\kappa$ B, responsável pela transcrição de NLRP3 e da produção de pró-IL-1 $\beta$ . Tschopp & Schroder (2010) já haviam considerado que diferentes vias de sinalização DAMPs convergem e ativam o inflamassoma NLRP3 via produção de EROs.

A ativação de NLRP3 pode ocorrer como consequência de uma forma comum de estresse celular iniciado por diferentes estímulos, como a liberação de EROs (Lamkanfi & Dixit, 2012). Segundo Martinon (2010), a geração de EROs pode contribuir para o desequilíbrio nas defesas antioxidantes, levando a um quadro de estresse oxidativo. A

administração de antioxidantes tem sido apontada como uma forma de inibir o inflamassoma NLRP3.

Caspases são proteases de cisteinil aspartato importantes nos mecanismo de apoptose e inflamação (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004). A caspase-1 é uma importante proteína inflamatória sintetizada na forma de pró-caspase-1 e se torna biologicamente ativa quando o inflamassoma inicia seu processo de formação (Strowig et al., 2012; Davis et al., 2011). É reconhecido pela literatura que alguns inflamassomas, entre eles o NLRP3, são responsáveis pelo processo de ativação da caspase-1, levando ao processamento e liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Schroder & Tschopp, 2010).

No presente trabalho, o estresse oxidativo gerado no explante placentário pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contribuiu para o perfil inflamatório gerado ativando o inflamassoma NLRP3, caspase-1 e induzindo a liberação de IL-1 $\beta$ . Segundo Lamkanfi et al. (2011), a produção de IL-1 $\beta$  está associada a danos teciduais e inflamação, sendo que ativação do inflamassoma pode estar relacionada a esses fatores.

A expressão gênica e os níveis proteicos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram significativamente mais elevados quando cultivados com 100 e 1000  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação ao grupo controle. A menor expressão gênica e produção dessas citocinas observadas em concentrações mais baixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderiam ser decorrentes da regulação exercida por IL-10 nessas células. O predomínio de IL-10 na gestação normal atua na regulação da resposta inflamatória que ocorre na gestação pelo controle da expressão gênica de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Já é conhecido que a IL-10 exerce efeito inibidor sobre a produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Moore et al., 2001).

Os níveis elevados de TNF- $\alpha$  em gestantes pré-eclâmpicas poderiam ativar o inflamassoma pelo seu efeito estimulador sobre o NF- $\kappa$ B. A síntese de TNF- $\alpha$ , bem como da IL-1 $\beta$  é regulada, em parte, pelo NF- $\kappa$ B, que está mais ativo em células de gestantes com PE (Giorgi et al.,

2012). Esse fator de transcrição regula a transcrição de genes relacionados à inflamação (Matsusaka et al., 1993; Striz et al., 2011) e o TNF- $\alpha$ , por sua vez, age estimulando a ativação de NF- $\kappa$ B, mantendo um ciclo de ativação celular (Vallabhapurapu & Karin, 2009). Sendo assim, apesar de não estar diretamente relacionado com o inflamassoma, o TNF- $\alpha$  é uma importante citocina inflamatória produzida no primeiro sinal de ativação desse complexo multiproteico.

Os baixos níveis de expressão gênica e proteica de IL-10 nas culturas expostas a altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstram que há aumento da resposta inflamatória mediada pelo estresse oxidativo, na medida em que as concentrações vão aumentando. Corroborando com essa hipótese, os explantes cultivados na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (cultura controle) apresentaram maior expressão gênica de IL-10. Esses resultados estão de acordo com Cristofalo et al. (2013), que demonstraram baixa expressão proteica endógena de IL-10 em monócitos de gestantes com PE comparados com gestantes normotensas. O estresse oxidativo, causado pelas altas doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece diminuir os níveis dessa citocina reguladora, o que pode ser explicado pelo desequilíbrio causado pelo estado inflamatório gerado (Harmon et al., 2016).

A ativação do inflamassoma e a autofagia são elementos essenciais do sistema imune inato e distúrbios nesses processos têm sido implicados em diversas doenças inflamatórias e infecciosas (Abdelaziz et al., 2015).

De acordo com a literatura, a ativação da autofagia está relacionada a aumento na concentração de proteínas-chaves relacionadas a essa via de degradação, como beclin-1 e LC3 (Klionsky et al., 2012). LC3 é uma proteína citosólica presente em células de mamíferos, que é convertida em LC3-II e recrutada para as membranas do autofagossoma durante o processo autofágico, sendo considerada o principal marcador associado à formação do autofagossoma completo. Assim, pode-se dizer

que a detecção de LC3 é um marcador confiável para se constatar a ativação da autofagia (Tanida et al., 2008; Klionsky et al., 2012).

Oh et al. (2008) demonstraram que o ambiente hipóxico placentário e a presença de TNF- $\alpha$  provocaram regulação positiva na proteína relacionada à autofagia LC3-II em linhagem de células trofoblásticas. Os resultados obtidos para a expressão gênica de LC3-II demonstrados em nosso estudo somados à expressão gênica de TNF-  $\alpha$  corroboram com esses dados da literatura, já que o RNAm de LC3-II também esteve mais expresso em culturas de explantes com maiores doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nossos resultados demonstraram expressão gênica elevada de beclin-1 em condições de estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo que esses dois processos se correlacionam, o que também foi sugerido por Ferraro & Cecconi (2007).

Estudos com células trofoblásticas demonstram que em gestações complicadas por PE os marcadores de autofagia LC3-II e beclin-1 e a formação do autofagossoma estão mais evidentes do que em placentas de gestantes normais (Chen et al., 2012). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que observamos maior expressão gênica da proteína LC3-II em culturas com altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em um estado semelhante ao que acontece em gestações com complicações.

Os resultados demonstraram correlação positiva entre a expressão gênica de LC3-II e NLRP3 em culturas com 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $r=0,6941$ ;  $p=0,0029$ ), concordando com dados da literatura que sugerem a regulação do inflamassoma pela autofagia (Shi et al., 2012).

O fato da proteína p62 apresentar sua expressão gênica seguindo o padrão de LC3-II e beclin-1 pode sugerir a produção de RNAm para transcrição da proteína, que será degradada conforme a autofagia seja ativada. Essa proteína tem função significativa na regulação do estresse oxidativo, doenças degenerativas e carcinogênese (Lin et al., 2013). A relação entre ativação do inflamassoma pela autofagia pode explicar a expressão gênica de p62 elevada em condições de estresse oxidativo.

Harris et al. (2011) sugeriram que os inflamassomas podem ser degradados por autofagossomas através dessa proteína. Foi observada correlação positiva entre a expressão gênica de p62 e de NLRP3 na concentração de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $r=0,5206$ ;  $p=0,0387$ ) e entre a expressão gênica de p62 e caspase-1 na mesma concentração. ( $r=0,7890$ ;  $p=0,0008$ ).

Em conjunto, os resultados do presente estudo confirmam que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  induz estresse oxidativo em tecido placentário, evidenciado pela ativação do inflamassoma, produção aumentada de citocinas inflamatórias e de agentes antioxidantes, que por sua vez induzem a geração de autofagia, no sentido de controlar o estado inflamatório induzido pelo inflamassoma (figura 20). O estresse oxidativo também pode contribuir para a senescência do tecido placentário e para a fisiopatologia de diversas doenças, como PE e restrição de crescimento fetal (Burton et al., 2016). Dessa forma, as iniciativas para redução do estresse sobre o tecido trofoblástico devem ser consideradas para investigações futuras. Nesse sentido, a utilização de produtos naturais com ação antioxidante e anti-inflamatória poderão ser empregados para reduzir o estresse oxidativo, induzir a autofagia e diminuir a ativação do inflamassoma no tecido placentário.

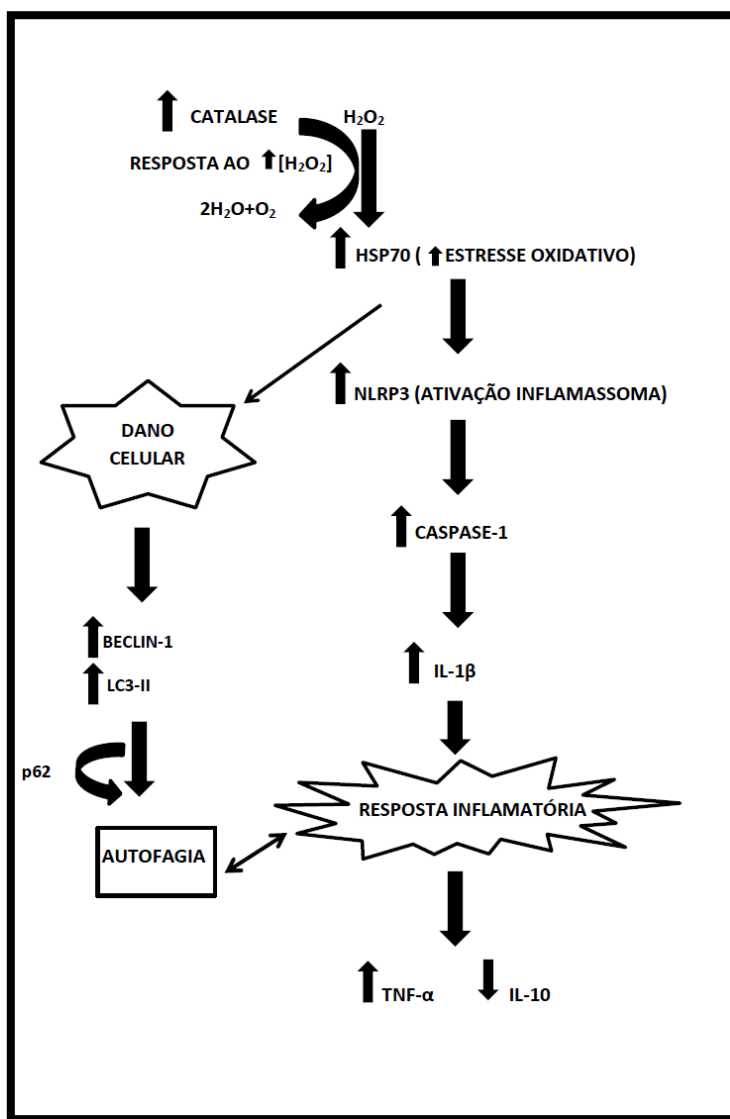


**Figura 20.** Esquema de ativação do inflamassoma NLRP3 por meio do estresse oxidativo e sua relação com a autofagia.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelaziz DH, Khalil H, Cormet-Boyaka E, Amer AO. The cooperation between the autophagy machinery and the inflammasome to implement an appropriate innate immune response: do they regulate each other? Immunol Rev. 2015; 265(1):194-204.

- Alsat E, Wyplosz P, Malassiné A, Guibourdenche J, Porquet D, Nessmann C, Evain-Brion D. Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiol.* 1996; 168(2):346-353.
- Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev.* 2005; 11:34-45.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002; 277(17):15028-15034.
- Barut F, Barut A, Dogan Gun B, Kandemir NO, Aktunc E, Harma M, Harma MI, Ozdamar SO. Expression of heat shock protein 70 and endothelial nitric oxide synthase in placental tissue of preeclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pathol Res Pract.* 2010; 206(9):651-656.
- Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009; 183(2):787-791.
- Birnbaum G. Stress proteins: their role in the normal central nervous system and in disease states, especially multiple sclerosis. *Springer Semin Immunopathol.* 1995; 17(1):107-118.
- Burton, GJ., Charnock-Jones, DS., Jauniaux, E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction.* 2009; 138(6): 895-902.
- Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2004; 11(6):342-52.
- Burton GJ, Yung HW, Murray AJ. Mitochondrial - Endoplasmic reticulum interactions in the trophoblast: Stress and senescence. *Placenta.* 2016; 4. pii: S0143-4004 (16) 30052-2.
- Chen GQ, Zhang H, Qi HB, Yao ZW, Gao L, Qiu CL. Effects and mechanisms of autophagy of trophoblast cells in severe preeclampsia. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2012; 28(3):294-296.
- Choi AJS, Ryter SW. Autophagy in Inflammatory Diseases. *Int J Cell Biol.* 2011; 10.1155/2011/732798.
- Cindrova-Davies, T. Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia—from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta.* 2009; 3:55-65.
- Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC,

- Witkin SS, Peraçoli MT. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res.* 2013; 47(4):268-275.
- Curtis S, Jones CJ, Garrod A, Hulme CH, Heazell AE. Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013; 26(4):339-346.
- Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:707-735.
- Díaz P, Sibley CP, Greenwood SL. Oxygen-Sensitive K<sup>+</sup> Channels Modulate Human Chorionic Gonadotropin Secretion from Human Placental Trophoblast. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149021.
- Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis.* 2003; 187 (2):370-384.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:519-550.
- Dragowska WH, Weppeler SA, Qadir MA, Wong LY, Franssen Y, Baker JH, Kapanen AI, Kierkels GJ, Masin D, Minchinton AI, Gelmon KA, Bally MB. The combination of efitinib and RAD001 inhibits growth of HER2 overexpressing breast cancer cells and tumors irrespective of trastuzumab sensitivity. *BMC Cancer.* 2011; 11,420 10.1186/1471-2407-11-420.
- Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 2010; 464(7293):1357-1361.
- Duhig K, Chappell LC, Shennan AH. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *Obstet Med.* 2016; 9(3):113-116.
- Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009; 33(3):130-137.
- Ferraro E, Cecconi F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 462(2):210-219.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004; 384(2):201-232.
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol.* 2010; 0.1155/2010/21407.

- Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF- $\kappa$ B pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol*. 2012; 95(1-2):67-72.
- Gohil JT, Patel PK, Gupta P. Evaluation of oxidative stress and antioxidant defence in subjects of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol India*. 2011; 61(6):638-640.
- Grishman, E. K., White, P. C., & Savani, R. C. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 [beta] in the development and progression of type 1 diabetes. *Pediatric research*, 2012; 71(6): 626-632.
- Haneklaus M, O'Neill LA, Coll RC. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25 (1): 40-45.
- Harmon AC, Cornelius DC., Amaral LM., Faulkner JL., Cunningham MW., Wallace K, LaMarca B. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clinical Science*. 2016; 130(6), 409-419.
- Harris J. Autophagy and IL-1 family cytokines. *Front Immunol*. 2013; 4:83. 10.3389/fimmu.2013.00083.
- Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, Lambe EM, Creagh EM, Golenbock DT, Tschoep J, Kornfeld H, Fitzgerald KA, Lavelle EC. Autophagy controls IL-1 $\beta$  secretion by targeting pro-IL-1 $\beta$  for degradation. *J Biol Chem*. 2011; 286(11):9587-9597.
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009; 43:67-93.
- Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ. The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Hum Pathol*. 2003; 34(12):1265-1275.
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*. 2000; 157(6):2111-2122.
- Jo EK, Shin DM, Choi AMK. Autophagy: cellular defense to excessive inflammation. *Microbes Infect*. 2012; 14: 119- 125.
- Kalinderis M, Papanikolaou A, Kalinderi K, Ioannidou E, Giannoulis C, Karagiannis V, Tarlatzis BC. Elevated serum levels of interleukin-6, interleukin-1 $\beta$  and human chorionic gonadotropin in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 66(6):468-475.
- Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate

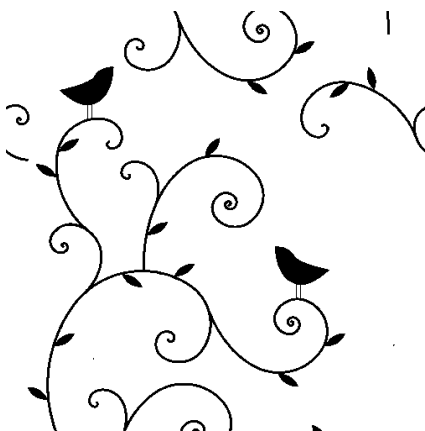
- students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013; 1(1):244–257.
- Kaur G, Mishra S, Sehgal A, Prasad R. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. *Mol Cell Biochem.* 2008; 313(1–2):37–44.
- Kelekar, A. Autophagy. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006;c1066(1), 259-271.
- Kharfi A, Giguère Y, De Grandpré P, Moutquin JM, Forest JC. Human chorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. *Clin Biochem.* 2005; 38(8):717-721.
- Kharfi-Aris A, Leblanc S, Ouellet A, Moutquin JM. Dual action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on placental hCG secretion: implications for oxidative stress in preeclampsia. *Clin Biochem.* 2007 40(1-2):94-97.
- Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res.* 2011; 4:39-49.
- Klionsky DJ., Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli, K., Ahn, HJ. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2012; 8(4), 445-544.
- Krebiehl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, Kieper N, Maurer B, Waak J, Wolburg H, Gizatullina Z, Gellerich FN, Woitalla D, Riess O, Kahle PJ, Proikas-Cezanne T, Krüger R. Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One.* 2010; 5(2):e9367.
- Lamark T, Kirkin V, Dikic I, Johansen T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle.* 2009; 1;8(13):1986-1990.
- Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012; 28:137-161.
- Lamkanfi, M., Walle, L. V., Kanneganti, TD. Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunological reviews.* 2011;243(1), 163-173.
- Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* 2005; 6:62, 10.1186/1471-2105-6-62.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.

- Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011;469: 323- 335.
- Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*. 2005; 115(10):2679-2688.
- Lin X, Li S, Zhao Y, Ma X, Zhang K, He X, Wang Z. Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy. *DNA Cell Biol*. 2013; 32(5):220-227.
- Lugin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem*. 2014; 395(2):203-230.
- Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol*. 2010; 40(3), 616-619.
- Matsubara T, Matsubara Y, Nawa A. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(3):4600-4614.
- Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(21):10193-10197.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011; 147(4):728-741.
- Mizushima, N. Physiological functions of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009; 335:71-84.
- Molvarec A, Rigó J Jr, Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z. Increased serum heat shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress Chaperones*. 2009; 14(2): 151-159.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:683-765.
- Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 2009; 137(6):1001-1004.
- Mulla MJ, Myrtolli K, Potter J, Boeras C, Kavathas PB, Sfakianaki AK, Tadesse S, Norwitz ER, Guller S, Abrahams VM. Uric acid induces trophoblast IL-1 $\beta$  production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 65(6):542-548.
- Oh SY, Choi SJ, Kim KH, Cho EY, Kim JH, Roh CR. Autophagy-related proteins, LC3 and Beclin-1, in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. *Reprod Sci*. 2008;15(9):912-920.

- Ortiz-Masiá D, Cosín-Roger J, Calatayud S, Hernández C, Alós R, Hinojosa J, Apostolova N, Alvarez A, Barrachina MD. Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol.* 2014; 7:929-938.
- Padmini E, Lavanya S. HSP70-mediated control of endothelial cell apoptosis during pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 156(2):158-164.
- Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2013; 100(2):129-134.
- Perkins AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006; 46(2):77-83.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010; 90(4):1383-1435.
- Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 2004; 114(6):744-754.
- Romão M, Weel IC, Lifshitz SJ, Peraçoli MT, Witkin SS. Elevated hyaluronan and extracellular matrix metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2014; 289(3):575-579.
- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging.* 2012; 4(3):166-175.
- Schroder K, Tschopp J. Cell. The inflammasomes. 2010; 140(6):821-832.
- Sheikhi A, Razdar S, Rahmanpour H, Mousavinasab N, Ganji HB, Jafarzadeh A. Higher expression of HSP70 and LOX-1 in the placental tissues of pre-eclampsia pregnancies. *Clin Exp Hypertens.* 2015; 37(2):128-135.
- Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol.* 2012; 13(3):255-263.
- Shintani T, Klionsky D. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 2004; 306:990-995.

- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991; 91(3):31-38.
- Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Liu XD, Brabcova I, Sekerkova A, Poole JA, Jaresova M, Slavcev A, Rennard SI. Epithelial cells modulate genes associated with NF kappa B activation in co-cultured human macrophages. *Immunobiology.* 2011; 216(10):1110-1116.
- Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012; 481(7381):278-286.
- Tanida, I, Ueno, T, Kominami, E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol.* 2008; 445:77-88.
- Tchetina EV, Poole AR, Zaitseva EM, Sharapova EP, Kashevarova NG, Taskina EA, Alekseeva LI, Semyonova LA, Glukhova SI, Kuzin AN, Makarov MA, Makarov SA. Differences in Mammalian target of rapamycin gene expression in the peripheral blood and articular cartilages of osteoarthritic patients and disease activity. *Arthritis.* 2013; 461486, 10.1155/2013/461486.
- Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *Am J Pathol.* 2006; 169(2):400-404.
- Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(3):210-215.
- Tsoi SC, Zheng J, Xu F, Kay HH. Differential expression of lactate dehydrogenase isozymes (LDH) in human placenta with high expression of LDH-A(4) isozyme in the endothelial cells of pre-eclampsia villi. *Placenta.* 2001; 22(4):317-322.
- Vanderlelie J, Venardos K, Clifton VL, Gude NM, Clarke FM, Perkins AV. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta.* 2005; 26(1):53-58.
- Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:693-733.
- Weedon Fekjær, MS, Taskén K. Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta.* 2011; 33:87-91.
- Weel IC. Avaliação do inflamassoma NLRP3 e autofagia em placentas de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2016.
- Weel IC, Baergen RN, Romão-Veiga M, Borges VT, Ribeiro VR, Witkin SS, Bannwart-Castro C, Peraçoli JC, De Oliveira L, Peraçoli MT. Association

- between Placental Lesions, Cytokines and Angiogenic Factors in Pregnant Women with Preeclampsia. *PLoS One*. 2016; 11(6):e0157584.
- Wiktor H, Kankofer M. Catalase activity in normal and preeclamptic placentas. *Ginekol Pol*. 2001; 72(12):1228-1232.
- Wu F, Tian FJ, Lin Y. Oxidative Stress in Placenta: Health and Diseases. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:293271.
- Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP. Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 294(4):777-787.
- Yang CS, Shin DM, Jo EK. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *Int Neurourol J*. 2012; 16:2-12.
- Yan JY, Xu X. Relationships between concentrations of free fatty acid in serum and oxidative-damage levels in placental mitochondria and preeclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2012;47(6):412-417.
- Yorimitsu T, Klionsky DJ. Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol*. 2007; 17(6):279-285.
- Yu, J., Feng, L., Hu, Y., & Zhou, Y. Effects of SAC on oxidative stress and NO availability in placenta: potential benefits to preeclampsia. *Placenta*. 2012; 33(6):487-494.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100:15077–15082.



## *Capítulo 2*

*“Foi o tempo que investiste em tua rosa que fez tua  
rosa tão importante.”*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

**Esse capítulo foi redigido de acordo com as normas de publicação  
da revista *Scientific Reports*, Impact factor 2016: 5,228.**

## **Cover letter**

Botucatu, January, 12, 2017  
Prof. Philip Campbell  
Editor-in-Chief  
Nature Publications

We would like to submit the manuscript “**Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress induces autophagy and inflammasome activation in placental explants**” to the Editorial Board of Scientific Reports. In the present study we demonstrated the induction of autophagy and inflammasome in placental explants from pregnant women. The results show that oxidative stress may be responsible for the disturbances in the mechanisms involved in the pathophysiology of pregnancies disorders.

The data included in this paper represent an original work that has not been published previously and it is not currently being considered by another journal. Each author has seen and approved the contents of the submitted manuscript.

### **Suggested reviewers:**

Gendie Lash – NewCastle University, UK

Marijke Faas – University of Groninger, The Netherlands

Maria Teresa Cruz Rosete – University of Coimbra, Portugal

Thank you very much for the attention.

Sincerely yours,

Corresponding author: Leandro Gustavo de Oliveira, PhD

Department of Gynaecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil. Phone: 55 14 3880-1388

Email address: leandrogo@fmb.unesp.br

Comprovante de Encaminhamento para Publicação

12/01/2017

Scientific Reports



manuscripttrackingsystem

SCIENTIFIC REPORTS

tracking system home | author instructions | reviewer instructions | help | tips | logout | journal home

|                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Manuscript #                 | SREP-17-01645                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Current Revision #           | 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Submission Date              | 11th January 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Current Stage                | Quality Check Started                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Title                        | Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress induces autophagy and inflammasome activation in placental explants                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Manuscript Type              | Original Research                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Corresponding Author         | Prof. Leandro De Oliveira (leandrogo@fmb.unesp.br) (Botucatu Medical School, São Paulo State University)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Contributing Authors         | Miss Priscila Nunes , Prof. Maria Terezinha Peracoli , Mrs. Mariana Romao-Veiga , Miss Mariana Leticia Matias , Miss Vanessa Ribeiro , Prof. Jose Carlos Peracoli , Dr. Jose Ricardo Rodrigues                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Authorship                   | Yes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Abstract                     | The placenta is a multifunctional organ that can suffer with imbalances between pro-oxidant and antioxidant molecules. Autophagy is a self-degradative process responsible for removing damaged organelles and proteins from the cytoplasm. It has a role on reduction of inflammation by regulating inflammasome activation, an essential complex for pro-inflammatory cytokine production. The aim of this study was to evaluate whether hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) -mediated oxidative stress may induce autophagy and inflammasome activation on placental explants. Cultures were performed in different concentrations of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and cell viability was determined in order to define the best culture duration for the experiment. Protein levels of catalase, Hsp70 and IL-10 as well as gene expressions of LC3-II and IL-10 were higher in cultures without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exposure. Concentrations of SOD, hCG and TNF-α and the IL-1β gene expression were higher in 100μM of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Gene expressions of beclin-1, p62 and TNF-α and IL-1β protein levels were elevated in cultures exposed to 1000μM of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . The concentration of 1000μM of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> led to inflammasome activation, identified by increasing gene expression of NLRP3 and caspase-1. Our results confirm that H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induces oxidative stress on placental tissue and demonstrate that cell responses to this stress involve autophagy and inflammasome activation. |
| Techniques                   | Life sciences techniques [Cell/tissue technologies]; Life sciences techniques, Cell/tissue technologies [Tissue culture]; Life sciences techniques [Gene expression analysis]; Life sciences techniques, Gene expression analysis [PCR-based techniques]; Life sciences techniques [Protein techniques]; Life sciences techniques, Protein techniques [Protein expression];                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Subject Terms                | Biological sciences/Immunology/Inflammation/Inflammasome<br>Biological sciences/Immunology/Cytokines/Interleukins<br>Biological sciences/Immunology/Cytokines/Tumour-necrosis factors<br>Biological sciences/Cell biology/Autophagy/Macroautophagy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Competing Financial Interest | There is <b>NO</b> Competing Interest.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Applicable Funding Source    | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Nunes]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Nunes]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Peracoli]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Romao-Veiga]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Matias]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Ribeiro]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Peracoli]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Rodrigues]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [De Oliveira]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Manuscript Items

http://mts-srep.nature.com/cgi-bin/main.plex

1/2

12/01/2017

Scientific Reports

1. Author Cover Letter [PDF \(32KB\)](#) [Source File \(DOC\) 2191KB](#)
2. Merged File containing manuscript text and 6 Figure files. [PDF \(1346KB\)](#)
  - a. Article File [PDF \(87KB\)](#) [Source File \(DOC\) 163KB](#)
  - b. Figure 1 [PDF \(59KB\)](#) [Source File \(TIF\) 204KB](#)
  - c. Figure 2 [PDF \(289KB\)](#) [Source File \(TIF\) 4204KB](#)
  - d. Figure 3 [PDF \(171KB\)](#) [Source File \(TIF\) 3004KB](#)
  - e. Figure 4 [PDF \(326KB\)](#) [Source File \(TIF\) 5458KB](#)
  - f. Figure 5 [PDF \(160KB\)](#) [Source File \(TIF\) 2816KB](#)
  - g. Figure 6 [PDF \(258KB\)](#) [Source File \(TIF\) 4007KB](#)

**More Manuscript Info and Tools**[Send Manuscript Correspondence](#)[Check Status](#)[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#) | [terms of use](#)

## **Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress induces autophagy and inflammasome activation in placental explants**

Priscila R. Nunes<sup>1</sup>, Maria T. Peraçoli<sup>2</sup>, Mariana Romão-Veiga<sup>2</sup>, Mariana L. Matias<sup>1</sup>, Vanessa R. Ribeiro<sup>1</sup>, Jose C. Peraçoli<sup>1</sup>, José R. Rodrigues<sup>1</sup>, Leandro De Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Gynaecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, 18618-691, Botucatu, São Paulo, Brazil*

\*Corresponding author: Department of Gynaecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil. Phone: 55 14 3880-1388

Email address: [leandrogo@fmb.unesp.br](mailto:leandrogo@fmb.unesp.br)

## ABSTRACT

The placenta is a multifunctional organ that can suffer with imbalances between pro-oxidant and antioxidant molecules. Autophagy is a self-degradative process responsible for removing damaged organelles and proteins from the cytoplasm. It has a role on reduction of inflammation by regulating inflammasome activation, an essential complex for pro-inflammatory cytokine production. The aim of this study was to evaluate whether hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )-mediated oxidative stress may induce autophagy and inflammasome activation on placental explants. Cultures were performed in different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and cell viability was determined in order to define the best culture duration for the experiment. Protein levels of catalase, Hsp70 and IL-10 as well as gene expressions of LC3-II and IL-10 were higher in cultures without  $\text{H}_2\text{O}_2$  exposure. Concentrations of SOD, hCG and TNF- $\alpha$  and the IL-1 $\beta$  gene expression were higher in 100 $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Gene expressions of beclin-1, p62 and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  protein levels were elevated in cultures exposed to 1000 $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The concentration of 1000 $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  led to inflammasome activation, identified by increasing gene expression of NLRP3 and caspase-1. Our results confirm that  $\text{H}_2\text{O}_2$  induces oxidative stress on placental tissue and demonstrate that cell responses to this stress involve autophagy and inflammasome activation.

## Introduction

The formation of reactive oxygen species (ROS), known as pro-oxidant factors, is a characteristic of aerobic cellular metabolism. However, the production of pro-oxidant factors must be balanced by antioxidant factors to maintain cellular homeostasis. The imbalance between pro and antioxidant factors in favor to pro-oxidant products constitutes the oxidative stress<sup>1</sup>. This imbalance leads to lipid peroxidation, cellular modifications and damages, alters protein production and the DNA structure<sup>2</sup>.

In spite of the pathological processes related to oxidative stress, it is also possible to recognize its presence in physiological conditions. It has been demonstrated that pregnancy is highly marked by oxidative metabolism due to the progressive increase in oxygen demand in either maternal or fetal compartments. This increase in demand has the consequence of greater formation of ROS. However, the balance between pro and antioxidant factors in healthy pregnancies prevents the exacerbation of oxidative stress<sup>3</sup>.

The placental development is highly orchestrated in order to maintain its initial formation in a hypoxic condition until 10-12 gestational weeks<sup>4</sup>. Burton *et al.* reported a real blockage of the maternal spiral arterioles by trophoblasts at points of contact with the intervillous space around 8 gestational weeks. It is supposed that this mechanical process prevents the release of excessive  $O_2^-$  radicals at the maternal-fetal interface and protects the placental tissue during these early stages of differentiation<sup>5</sup>. This blockage performed by trophoblasts is gradually dissipated between 10-12 gestational weeks, allowing progressive

increase in oxygen tension at the maternal-fetal interface. Interestingly, this increase in oxygen tension is coincident with an increase in the antioxidant properties of the syncytiotrophoblast<sup>5,6</sup>.

Alterations in trophoblast functions in consequence of the imbalance between pro and antioxidant properties may lead to placental related disorders like preeclampsia (PE). This is a multifactorial disease marked by breaking of immunological tolerance, abnormalities in the uterine circulatory development and oxidative stress. Clinical manifestations of preeclampsia result from intense systemic inflammatory response and endothelial dysfunction<sup>4,7</sup>.

Autophagy is an evolutionarily conserved catabolic process through which aggregates of degraded proteins or damaged organelles, such as the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus or mitochondria are eliminated by lysosomal processes<sup>8,9</sup>. During autophagy, a double membrane vesicle called autophagosome surrounds the cytoplasmic region containing the material to be removed. This autophagosome fuses to the lysosome to form the autolysosome. This complex degrades the internalized material and releases the components back into the cytoplasm in order to provide substrates for anabolic pathways and energy production. Autophagy functions as a natural and essential mechanism against inflammatory, infectious, neurodegenerative and neoplastic diseases<sup>10</sup>.

The autophagosome formation is dependent of beclin-1 protein and the *light chain protein 3* (LC3-II)<sup>11,12</sup>. Beclin-1 promotes the recruitment of the double membranes and LC3-II assists in the sequestration of cytosolic proteins and organelles into the autophagosome<sup>13-16</sup>. Increased levels of the p62 adapter

protein, which accumulates in autophagy deficient cells, activate the proinflammatory nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B through a mechanism involving oligomerization and binding to the *tumor necrosis factor receptor* (TRAF6)<sup>17</sup>. Therefore, the concentration of p62 in the cytoplasm is inversely proportional to the occurrence of autophagy<sup>18</sup>.

Studies on autophagy in placental tissues are scarce, with most of them employing cell lines or trophoblastic cell cultures for *in vitro* evaluation of autophagy induced by nutrient and oxygen deprivation<sup>19</sup>. Induction of hypoxia on JEG-3 choriocarcinoma cell line to explore the regulatory mechanisms of proteins involved in autophagy demonstrated a slight increase in LC3-II and decrease in beclin-1 expression. Treatment of these cells with tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) induced a significant increase in LC3-II expression, without altering beclin-1 expression. Chorionic villi of normal placentas express either LC3-II or beclin-1 and elevated levels of LC3-II have been reported in preeclamptic placentas<sup>20</sup>.

Recent studies have demonstrated increased gene expression of *mammalian target of rapamycin* (mTOR) in peripheral blood leukocytes from patients with inflammatory diseases such as osteoarthritis and in mucosa of inflammatory bowel disease<sup>21</sup>. The activation of mTOR, associated with lower expression of LC3-II suggests a role for mTOR pathway on autophagy<sup>22</sup>.

Autophagy can control inflammation by regulating the activation of inflammasome, an intracellular protein complex, important for inflammatory cytokine production. The products of its activation are interleukins IL-1 $\beta$  and IL-

18, protective molecules in various infections<sup>23,24</sup>. Conditions of cellular stress or injury also activate the inflammasome process<sup>25</sup>. The different ligands and the exact mechanism of *Nod-like receptor 3* (NLRP3) activation are still unclear<sup>26</sup>. Several endogenous molecules, considered to be danger signals, such as uric acid crystals, cholesterol crystals, free radicals derived from oxygen and fatty acids can induce NLRP3 inflammasome activation, playing important roles on diseases involving inflammatory responses<sup>25,27</sup>.

The current knowledge on autophagy and inflammasome activation has linked these processes in several pathological conditions<sup>28</sup>. It prompted us to investigate whether oxidative stress, an alteration identified in placental related disorders, is able to induce autophagy and inflammasome activation on placental explants.

## Results

**Cell viability was preserved in 24 h culture.** Results of LDH enzyme determination in the supernatants of placental explants are shown in figure 1. Placental explants in cultures for 24 h presented satisfactory viability and therefore this time of culture was used for the entire experiment.

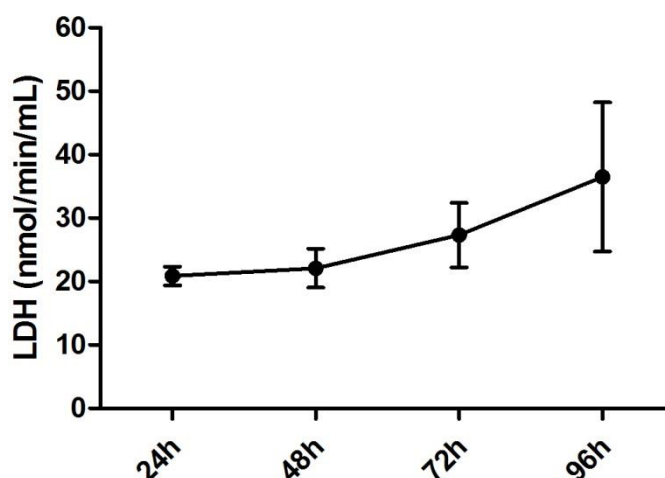


**Figure 1. Cell viability of placental explants.** Concentration of lactate dehydrogenase (LDH) detected in supernatant of placental explants culture of normotensive pregnant women after 24, 48, 72 and 96 h. Results expressed in mean  $\pm$  SD. (ANOVA)

**Increased levels of antioxidants were induced by  $H_2O_2$ .** Increasing concentrations of *superoxide dismutase* (SOD) and *human chorionic gonadotrophin* (hCG) were detected in cultures of placental tissue exposed to different concentrations of  $H_2O_2$ . However, this increase was limited to cultures exposed to 100  $\mu$ M of  $H_2O_2$ , with statistical difference ( $p < 0.05$ ) compared to control cultures. Regarding hCG, the increase limit was achieved in concentration of 10  $\mu$ M of  $H_2O_2$ . Cultures performed with 1,000  $\mu$ M of  $H_2O_2$ , presented a drop in antioxidant release (Fig. 2A and Fig. 2B).

Catalase and *heat shock protein 70* (Hsp70) concentrations were significantly increased during placental tissue exposure to different  $H_2O_2$  concentrations, with the highest levels observed in 100 and 1,000  $\mu$ M of  $H_2O_2$ ,

with a significant difference ( $p < 0.05$ ) in relation to controls (Fig.2C and Fig. 2D.).

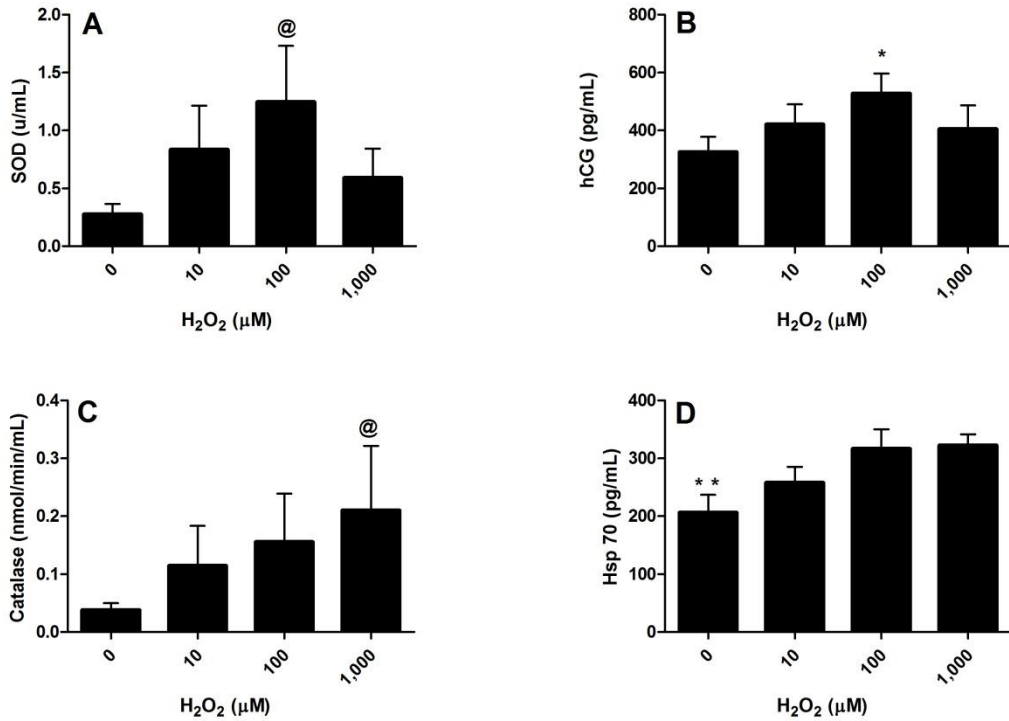


**Figure 2. Levels of oxidative stress markers.** (A) SOD (B) hCG (C) Catalase (D) Hsp70 concentrations detected in supernatant of placental explants culture of normotensive pregnant women. Results expressed as mean  $\pm$  SD. @ ( $p < 0.05$ ) vs. 0; \* ( $p < 0.05$ ) vs. 100, 1,000  $\mu M$ , \*\* ( $p < 0.05$ ) vs. 0, 10  $\mu M$ . (ANOVA)

### **Oxidative stress generated by $H_2O_2$ induced activation of inflammasome**

**NLRP3.** According to fig. 3, NLRP3 and caspase-1 gene expressions were higher in the concentrations of 1,000  $\mu M$  of  $H_2O_2$ , with statistical difference ( $p < 0.05$ ) to the concentrations of 10  $\mu M$  of  $H_2O_2$  and to non-exposed cultures. These results show that the concentration of 1,000  $\mu M$  of  $H_2O_2$  were able to induce the activation of the NLRP3 inflammasome.

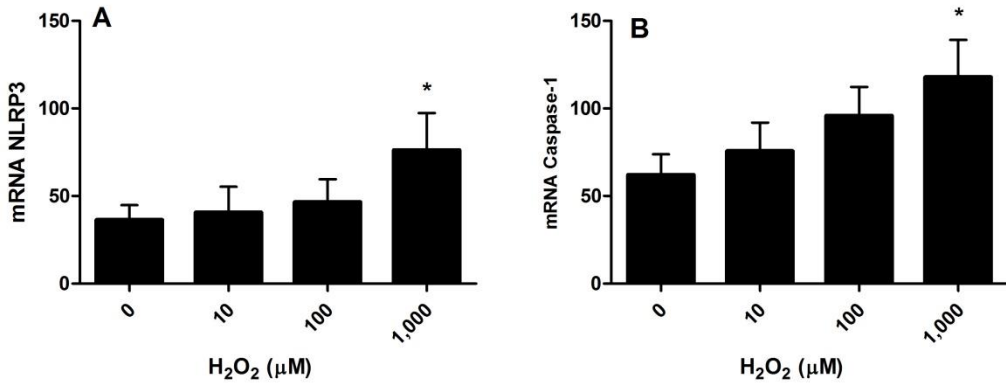


**Figure 3. Inflammasome activation in placental explants.** mRNA expression of NLRP3 (A) and caspase-1 (B) in explants of placental tissue obtained from normotensive pregnant women and cultured with different concentrations of  $H_2O_2$ . Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0.05$ ) vs. 0, 10  $\mu M$ . (ANOVA)

**Cytokine profile.** Gene expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were higher in explants cultured with 1,000  $\mu M$  of  $H_2O_2$  with significant difference ( $p < 0.05$ ) to culture without  $H_2O_2$  (Fig. 4A and Fig. 4C). The protein expressions of these cytokines (Fig. 4B and Fig. 4D) were higher in the supernatants from concentrations of 100 and 1,000  $\mu M$  of  $H_2O_2$ , with difference ( $p < 0.05$ ) to non-exposed and cultures with 10  $\mu M$  of  $H_2O_2$ . The protein expression of IL-1 $\beta$  was higher in 1,000  $\mu M$  of  $H_2O_2$  ( $p < 0.05$ ) than in the culture of 100  $\mu M$  of  $H_2O_2$  (Fig. 4D).

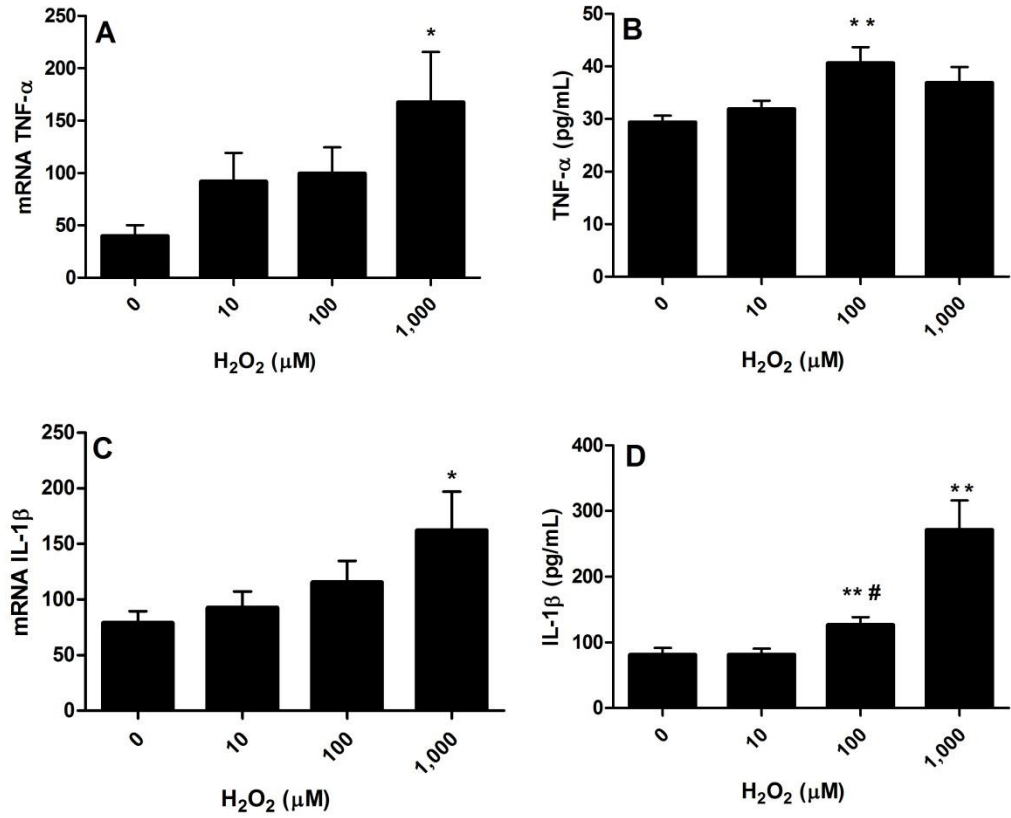


**Figure 4. Pro-inflammatory cytokine profile.** Gene and protein expression of pro-inflammatory cytokines TNF-α (A/B) and IL-1β (C/D) in explants of placental tissue obtained from normotensive pregnant women and cultured with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results expressed as mean ± SD. \* ( $p < 0.05$ ) vs. 0. (ANOVA)

The results of IL-10 cytokine determination in the supernatants of placental explants of normotensive pregnant women are shown in figure 5. In agreement with the gene expression (Fig. 5A), there was a decrease in the protein expression of this anti-inflammatory cytokine in front of increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig 5B).

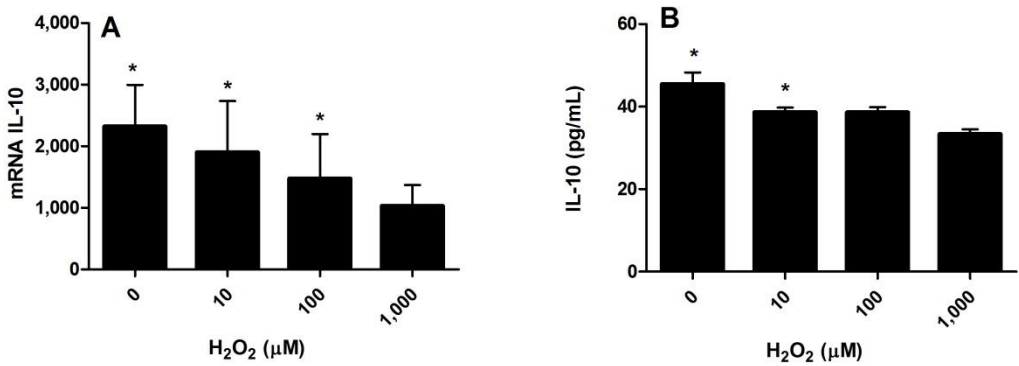


**Figure 5. Anti-inflammatory cytokine profile.** IL-10 mRNA and protein expression (A/B) in explants of placental tissue obtained from normotensive and cultured pregnant women with different concentrations of  $H_2O_2$ . Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0.05$ ) vs. 1,000  $\mu M$  (ANOVA)

**$H_2O_2$  induced activation of autophagy.** Gene expression of LC3-II (Fig. 6A) was increased in tissues exposed to the concentration of 1,000  $\mu M$  of  $H_2O_2$  compared to the non-exposed cultures, which means autophagy was more activated in this  $H_2O_2$  concentration, in response to the oxidative effect.

The gene expressions of beclin-1 and p62 (Fig. 6B and Fig. 6C) increased in front of increasing concentrations of  $H_2O_2$ , with the maximum value in 1,000  $\mu M$  of  $H_2O_2$  showing statistical difference ( $p < 0.05$ ) when compared to controls.

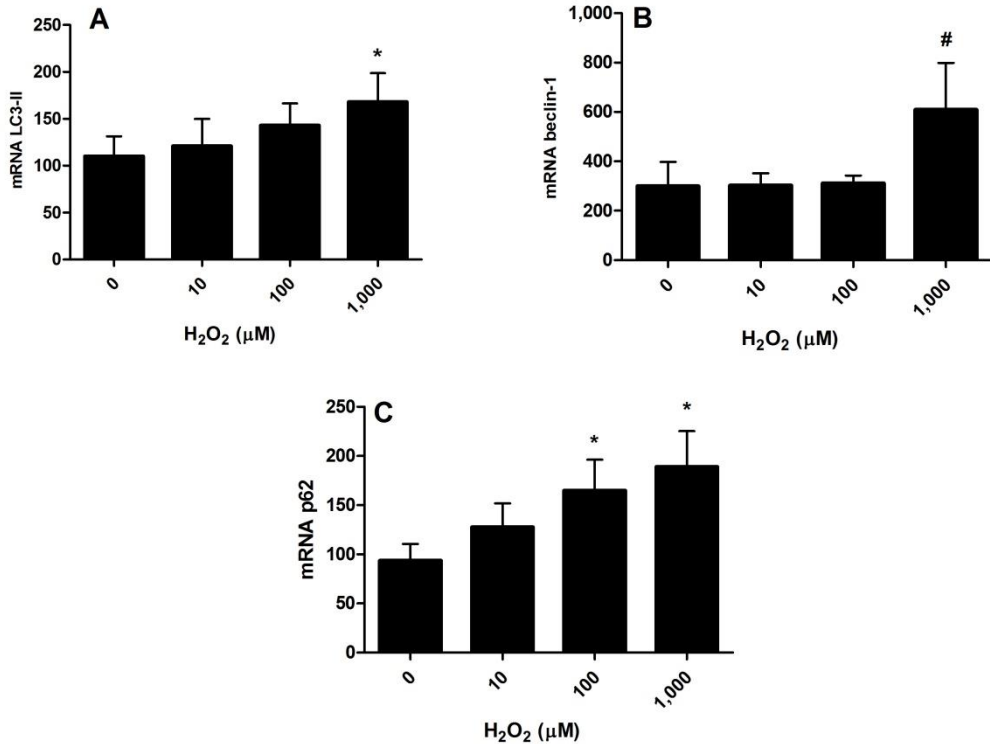


**Figure 6. Activation of autophagy.** mRNA expression of LC3-II (A), beclin-1 (B) and p62 (C) in explants of placental tissue obtained from normotensive pregnant women and cultured with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results expressed as mean  $\pm$  SD. \* ( $p < 0.05$ ) vs. 0; # ( $p < 0.05$ ) vs. 0, 10, 100  $\mu$ M. (ANOVA)

## Discussion

The present study evaluated the effect of oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the occurrence of autophagy and inflammasome activation in placental explants of pregnant women at term (39 - 40 weeks), without clinical or obstetric disorders identified and undergone to elective cesarean section. In our methodology we intended to reproduce experimentally the pathophysiology of obstetric complications related to placental dysfunction caused by uterine circulatory alterations. These alterations are responsible for the establishment of the hypoxia-

reoxygenation phenomenon and consequent production of ROS. Among obstetric complications related to this pathophysiology, PE, with or without associated fetal growth restriction, is undoubtedly the most studied.

The results of LDH release obtained in the culture supernatants of the placental explants exposed to  $H_2O_2$  at different times studied supported the methodology used, allowing the identification of the best culture time to be employed for determination of markers and gene expressions related to inflammation, autophagy and inflammasome activation. The low LDH activity in 24 h cultures indicated that the cells were viable for performing the experiments at this time of culture.

The association between experimental models and what is observed in the clinical practice is something always desired. Greater LDH gene expression and increased activity of this enzyme have been demonstrated in preeclamptic placentas<sup>29</sup>. Thus, the activity of this enzyme was considered as a marker in some pregnancy complications related to placental alterations. Increased LDH were demonstrated in placental tissues submitted to hypoxia-reoxygenation and these findings suggest a link between oxidative stress and cell death by apoptosis<sup>30</sup>.

In our study, the production of SOD and hCG showed similar patterns. They presented higher concentrations in the cultures treated with 100  $\mu M$  of  $H_2O_2$ , and reduced values in cultures with 1,000  $\mu M$  of  $H_2O_2$ . These results can be explained by a cellular depletion of antioxidant production. Decreased levels of SOD have been associated with complications in pregnancy, and the reduction of SOD activity has been demonstrated in placentas of patients with PE<sup>31</sup>. Interestingly,

supplementation with antioxidants before or during pregnancy has shown not be effective in preventing complications related to oxidative stress, which raises the importance of evaluating the intrinsic capacity of antioxidant production by the tissues involved in these complications, such as in the case of placenta<sup>32,33</sup>.

Autocrine/paracrine regulation and syncytiotrophoblast turnover are influenced by the balance between oxidative action and placental antioxidative capacity. The secretion of hCG, which is considered as a marker of syncytiotrophoblast function is modulated in vitro by oxygen tension and ROS<sup>34-36</sup>. Kharfi *et al.* reported positive correlation between hCG and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the maternal circulation suggesting an association between oxidative stress and hCG secretion<sup>37</sup>. Another study showed that hCG levels were proportional to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations up to 50 µM. After this concentration, there was a decrease in hCG production<sup>38</sup>. Our results corroborate with these authors, since hCG production by placental explants reached the maximum in cultures with 100 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with a decrease in the levels of this hormone in the highest concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In our experiments, the high levels of catalase produced by explants treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may have been responsible for cell viability maintenance against deleterious effects caused by oxidative stress. Many authors have studied the role of catalase in normal and preeclamptic placentas. The results obtained are still inconsistent and there are studies showing decrease in catalase activity in pregnancies complicated by PE, while others point out an increase in the activity of this enzyme<sup>39-41</sup>.

The activity of Hsp70 was similar to catalase, reaching higher activity in the

concentrations of 1,000  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Since Hsp70 has functions in cellular recovery from stress and against injury, this protein is also considered a marker of oxidative stress<sup>42,43</sup>.

Recent data has provided connections between inflammation and oxidative stress capable of propagating the inflammatory response<sup>44</sup>. These findings have highlighted the role of ROS in the regulation of NLRP3 inflammasome<sup>45</sup>.

In the present study, the oxidative stress induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  on placental explants contributed to the inflammatory profile generated by activating the NLRP3 inflammasome, caspase-1 and inducing the release of IL-1 $\beta$ . The production of IL-1 $\beta$  is associated with tissue damage and inflammation, and inflammatory activation may be related to these factors<sup>46</sup>.

We demonstrated that gene expressions of NLRP3 and caspase-1 have similar patterns, with greater expression in cultures exposed to the concentration of 1,000  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which means that this concentration was able to activate the NLRP3 inflammasome. The activation of this complex may occur as a consequence of a common form of cellular stress initiated by different stimuli, such as the release of ROS<sup>47,48</sup>.

Gene expressions and protein levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were significantly higher when placental explants were cultured with 100 and 1,000  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  compared to the control cultures. The lower gene expression and production of these inflammatory cytokines observed in lower concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  could be due to the regulation exerted by IL-10 on these cells. The predominance of IL-10 in normal pregnancies affects the regulation of the inflammatory response that

occurs in pregnancy by controlling the gene expressions of IL-1 $\beta$  and TNF-  $\alpha$ . It is known that IL-10 exerts an inhibitory effect on the production of inflammatory cytokines, such as IL-1  $\beta$  and TNF-  $\alpha$ <sup>49</sup>. Lower gene and protein expressions of IL-10 in explants cultures exposed to high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstrate that there is an increase in inflammatory response mediated by oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. To corroborate this hypothesis, the explants cultured in the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presented higher IL-10 gene expression. Oxidative stress, caused by high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, appears to decrease the levels of this regulatory cytokine, which can be explained by the imbalance caused by the inflammatory state<sup>50</sup>.

In the present study the higher gene expression of LC3-II, beclin-1 and p62 detected in cultures exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstrated that the oxidative stress generated was able to induce autophagy in placental explants. The high expressions of mRNA for LC3-II and TNF- $\alpha$  demonstrated in our study corroborate with other reports, showing that placental hypoxic environment and the presence of TNF- $\alpha$  caused a positive regulation in the autophagy-related protein LC3-II in a trophoblastic cell line<sup>20</sup>.

The similar patterns of p62, beclin-1 and LC3-II gene expressions suggest the production of mRNA for the p62 protein transcription, which will be degraded during autophagy activation. This protein plays a significant role on the regulation of oxidative stress, degenerative diseases and carcinogenesis<sup>51</sup>. The relationship between occurrence of inflammasome and autophagy activation may be explained by the elevation in gene expression of p62 under conditions of oxidative stress.

Inflammasome can be degraded by autophagosomes through this protein<sup>52</sup>.

Taken together, the results of the present study confirm that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces oxidative stress in placental explants, demonstrated by activation of NLRP3 inflammasome, increased production of inflammatory cytokines and antioxidant agents, which in turn induce the autophagy activation in order to control the inflammatory state. Activation of inflammasome and autophagy are essential elements of the innate immune system and disorders in these processes have been implicated in various inflammatory and infectious diseases<sup>53</sup>. Oxidative stress may also contribute to placental tissue senescence and to the pathophysiology of various placental related disorders, such as PE and fetal growth restriction<sup>54</sup>. Thus, initiatives to reduce stress on trophoblastic tissue should be considered for future researches. In this sense, the use of natural products with antioxidant and anti-inflammatory effects still need to be evaluated in order to reduce oxidative stress, induce autophagy and decrease the activation of inflammasome in placental tissue.

## **Material and Methods**

**Study Population and Ethics Statement.** This study consisted of 15 healthy pregnant women with normal evolution of the pregnancy, with no personal history of hypertensive disorders in pregnancy. These pregnant women were admitted to the Obstetrics Unit of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil between November 2015 and May 2016. Gestational age was calculated from the last menstrual period and confirmed by ultrasound dating. Exclusion criteria included chronic hypertension, multiple gestation, prior

preeclampsia, illicit drug use, and preexisting medical conditions such as diabetes, cancer, acute infectious disease, cardiovascular, autoimmune, renal and hepatic diseases. The study was approved by the Ethics Committee of the Botucatu Medical School, and written informed consent was obtained from all women involved in the study (CAAE Protocol number: 37160614500005411).

**Collection of placental tissue.** All placentas from normotensive pregnant women were delivered by cesarean section, without labor and were examined macroscopically and processed within 10 min of delivery. Fragments of approximately 5 x 5 cm were immediately removed from the central region of the placenta, constituting samples of the villous cytotrophoblast and the syncytiotrophoblast region in contact with the maternal side (basal plate). After collection, the trophoblastic tissue was washed in buffered saline (PBS) and separated from the decidual layer that is normally adhered to the basal plate. The terminal portions of the villi were evidenced in PBS (the villi were seen floating freely in the liquid) and dissected in small sections to constitute explants.

**Culture of placental explants with hydrogen peroxide.** The amount of villi used was 11 mg of placental tissue that was cultured in each well of 24-well plates (SPL Life Sciences, Korea) for 24 h for stabilization<sup>55</sup>. Cultures were performed in the absence of hydrogen peroxide or in the presence of 10, 100 and 1,000  $\mu$ M of  $H_2O_2$  for 4 h and 24 h in RPMI 1640 culture medium supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 40 mg/ml antibiotic/antimycotic

(Sigma-Aldrich) and 10% fetal bovine serum (Gibco BRL Life Technologies, The Netherlands) inactivated (complete RPMI medium).

After the culture periods, the explants were removed and submitted to RNA extraction for further analysis of the expression of genes related to inflammation (cytokines), autophagy and inflammasome. Culture supernatants were obtained, centrifuged at 2,000 g for 10 min and stored at -80 °C for determination of cytokines and oxidative stress markers by commercial kits.

**Cell viability assay.** The cell viability assay was conducted through the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) in supernatants of placental explant after 24, 48, 72 and 96 h of culture and was determined by commercial kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

**Oxidative stress markers.** Superoxide dismutase and Catalase activity was measured in supernatant of placental explant cultures after 4 h using commercial kits (Cayman Chemical Company, USA) and the reactions were developed according to the manufacturer's instructions.

Determinations of Hsp70 and hCG was performed in the supernatants of placental tissue cultured for 24 h using commercial kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA - Hsp70 and Sigma-Aldrich- hCG) according to the manufacturer's instructions. The sensitivity limits of these kits were: SOD: 0.005U/mL; Catalase: 2nmol/min/mL; Hsp70: 125pg/mL; hCG: 50pg/mL.

**Evaluation of the expression of transcripts related to inflammation.** The placental explants were evaluated for the expression of the genes encoding IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , LC3-II, beclin-1 and p62 proteins at the transcriptional level. In addition, the gene expression of the inflammasome was evaluated through the NLRP3 and caspase-1 genes.

Total RNA was extracted from the placentas using the Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, Canada) according to the manufacturer's protocol, and the Reverse Transcription-coupled polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed as described previously<sup>56</sup>. Briefly, isolated RNA was DNase I Amp Grade (Invitrogen) treated. Subsequently, the synthesis of complementary DNA (cDNA) was conducted using ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System, according to manufacturer's protocol. The RT-qPCR was made using RT GoTaq-qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) and the primer sequences used in this study are listed in Table 1. Each reaction was set in duplicate and the conditions for the RT-qPCR were as follows: initial denaturation at 96°C for 2 min and then 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 60 s, followed by a melting curve. Expression values of the analyzed transcripts were normalized to that of the enzyme-encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH).

The calculation of the differential expression of selected genes was carried out by the data processing method compared with a standard curve<sup>57</sup>. To analyze relative gene expression, we standardized the RNA expression levels in all samples to that of a single RNA sample, which was set to a value of 100.

**Table 1.** Primers for inflammasome and autophagy proteins, cytokines and GAPDH.

| Gene                                  | Sequence (5'-3')                                   | Name    | GeneBank    |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------|---------|-------------|
| <b><u>Caspase-1</u></b>               | Forward primer: (1065)AGACATCCCACAATGGGCTC(1084)   | CASP1   | NM_033292.3 |
|                                       | Reverse primer: (1172)TGAAAATCGAACCTTGCGGAAA(1151) |         |             |
| <b><u>NLRP3</u></b>                   | Forward primer: (2826)GAGGAAAAGGAAGGCCGACA(2845)   | NLRP3   | NM_004895.4 |
|                                       | Reverse primer: (2917)TGGCTGTTCACCAATCCATGA(2897)  |         |             |
| <b><u>IL-1<math>\beta</math></u></b>  | Forward primer: (544)GAGCAACAAGTGGTGTCTCC(564)     | IL1B    | NM_000576.2 |
|                                       | Reverse primer: (653)AACACGCAGGACAGGTACAG(634)     |         |             |
| <b><u>TNF-<math>\alpha</math></u></b> | Forward primer: (325)GCTGCACTTTGGAGTGATCG(344)     | TNF     | NM_000594.3 |
|                                       | Reverse primer: (462)GGGTTTGCTACAACATGGGC(443)     |         |             |
| <b><u>IL-10</u></b>                   | Forward primer: (361)AAGACCCAGACATCAAGGCG(380)     | IL10    | NM_000572.2 |
|                                       | Reverse primer: (445)ATTCGATGACAGCGCCGTAG(426)     |         |             |
| <b><u>p62</u></b>                     | Forward primer: (159)CGCTTCAGCTTCTGCTGC(176)       | SQSTM1  | NM_003900.4 |
|                                       | Reverse primer: (308)GTCCTCATCGCGGTAGTGC(290)      |         |             |
| <b><u>Beclin-1</u></b>                | Forward primer: (101)GTAGACCGGACTTGGGTGAC(120)     | BECN1   | NM_003766.3 |
|                                       | Reverse primer: (198)CATGGTGCTGTGTGGACG(179)       |         |             |
| <b><u>LC3-II</u></b>                  | Forward primer: (517)CCAGGAAACCTTCGGCTTCT(536)     | MP1LC3A | NM_032514.3 |
|                                       | Reverse primer: (632)CGGTAGAGGCAGCTCAGTTC(613)     |         |             |
| <b><u>GAPDH</u></b>                   | Forward primer: (684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703)     | GAPDH   | NM_002046.4 |
|                                       | Reverse primer: (801)GGCAGGGATGATGTCTGGA(782)      |         |             |

**Cytokine determination.** Cytokine concentrations in culture supernatants of placental explants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using Quantikine ELISA kits (R&D Systems) for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 according to the manufacturer's instructions. Assay sensitivity limits were 1.6 pg/mL for TNF- $\alpha$ , and 3.9 pg/mL for IL-1 $\beta$  and IL-10.

**Statistical Analysis.** All of the data were analyzed using one-way ANOVA, followed by post-hoc Tukey test using the statistical program PRISM (Graph

Prism for Windows, version 6.01, GraphPad, EUA) to compare the difference among the groups. A p value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

## References

1. Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* **91**, 31-38 (1991).
2. Kalyanaraman, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* **1**, 244–257 (2013).
3. Kaur, G., Mishra, S., Sehgal, A., Prasad, R. Alterations in lipidperoxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. *Mol Cell Biochem* **313**, 37–44 (2008).
4. Red-Horse, K. et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* **114**, 744-754 (2004).
5. Burton, G.J., Jauniaux, E. & Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 181:718–724 (1999).
6. Jauniaux, E. et al. Onset of maternal arterial bloodflow and placental oxidative stress: a possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*, 157:3251–3262 (2000).

7. Matsubara, T., Matsubara, Y. & Nawa, A. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Int J Mol Sci* **16**, 4600-4614 (2015).
8. Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J. Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol* **17**, 279-285 (2007).
9. Krebiehl, G. et al. Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One*. **5**, e9367. 10.1371/journal.pone.0009367 (2010)
10. Mizushima, N. Physiological functions of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* **335**, 71-84 (2009).
11. Shintani, T. & Klionsky D. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990-995 (2004)
12. Levine, B. & Yuan, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**, 2679-2688 (2005).
13. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J. & Heintz, N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 15077–15082 (2003).
14. Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I. & Johansen, T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle* **8**, 1986-1990 (2009).
15. Kelekar, A. Autophagy. *Ann N Y Acad Sci* **1066**, 259-271 (2006).

16. Choi, A.J.S. & Ryter, S.W. Autophagy in Inflammatory Diseases. *Int J Cell Biol* 2011:732798, 10.1155/2011/732798 (2011).
17. Moscat, J. & Diaz-Meco, M.T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* **137**,1001-1004 (2009).
18. Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H.W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. **469**, 323-335 (2011).
19. Curtis, S., Jones, C.J., Garrod, A., Hulme, C.H. & Heazell, A.E.  
Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med* **26**, 339-346 (2013).
20. Oh, S.Y. et al. Autophagy-related proteins, LC3 and Beclin-1, in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. *Reprod Sci* **15**, 912-920 (2008).
21. Tchetina, E.V. et al. Differences in Mammalian target of rapamycin gene expression in the peripheral blood and articular cartilages of osteoarthritic patients and disease activity. *Arthritis* 2013:461486, 10.1155/2013/461486 (2013).
22. Ortiz-Masiá, D. et al. Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol* **7**, 929-938 (2014).
23. Dinarello, C.A. & Fantuzzi, G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis* **187**, 370-384 (2003).

24. Dinarello, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**, 519-550.  
10.1146/annurev.immunol.021908.132612 (2009).
25. Yang, C.S., Shin, D.M. & Jo, E.K. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *Int Neurol J* **16**, 2-12 (2012)
26. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. & Flavell, R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**, 278-286 (2012).
27. Schroder, K. & Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell* **140**, 821-832 (2010).
28. Yuk, J.M. & Jo, E.K. Crosstalk between autophagy and inflammasomes. *Mol Cells* **36**, 393-399 (2013).
29. Tsoi, S.C., Zheng, J. Xu, F. & Kay, H.H. Differential expression of lactate dehydrogenase isozymes (LDH) in human placenta with high expression of LDH-A(4) isozyme in the endothelial cells of pre-eclampsia villi. *Placenta* **22**, 317-322 (2001).
30. Tjoa, M.L., Cindrova-Davies, T., Spasic-Boskovic, O. Bianchi, D.W. & Burton, G.J. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *Am J Pathol* **169**, 400-404 (2006).
31. Vanderlelie, J. et al. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta* **26**, 53-58 (2005).

32. Duhig, K., Chappell, L.C. & Shennan, A.H. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *Obstet Med* **9**, 113-116 (2016).
33. Wu, F., Tian, F.J. & Lin, Y. Oxidative Stress in Placenta: Health and Diseases. *Biomed Res Int* 2015:293271, 10.1155/2015/293271 (2015).
34. Alsat, E. et al. Hypoxia impairs cell fusion and fusion and differentiation process in human cytotrophoblast in vitro. *J Cell Physiol* **168**, 346-353 (1996).
35. Weedon-Fekjær, M.S. & Taskén, K. Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta* **33**, 87-91 (2011).
36. Díaz, P., Sibley, C.P., & Greenwood, S.L. Oxygen-Sensitive K<sup>+</sup> Channels Modulate Human Chorionic Gonadotropin Secretion from Human Placental Trophoblast. *PLoS One* **11**, e0149021.10.1371/journal.pone.0149021(2016).
37. Kharfi, A., Giguère, Y., De Grandpré, P., Moutquin, J.M. & Forest, J.C. Human chorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. *Clin Biochem* **38**, 717-721 (2005).
38. Kharfi-Aris A., Leblanc, S., Ouellet, A. & Moutquin, J.M. Dual action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on placental hCG secretion: implications for oxidative stress in preeclampsia. *Clin Biochem* **40**, 94-97 (2006).

39. Gohil, J.T., Patel, P.K. & Gupta, P. Evaluation of oxidative stress and antioxidant defence in subjects of preeclampsia. *J. Obstet Gynaecol India* **61**, 638-640 (2011).
40. Yan, J.Y. & Xu, X.  
Relationships between concentrations of free fatty acid in serum and oxidative-damage levels in placental mitochondria and preeclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **47**, 412-417 (2012).
41. Wiktor, H. & Kankofer, M. Catalase activity in normal and preeclamptic placentas. *Ginekol Pol* **72**, 1228-1232 (2001).
42. Birnbaum, G. Stress proteins: their role in the normal central nervous system and in disease states, especially multiple sclerosis. *Springer Semin Immunopathol* **17**, 107-118 (1995).
43. Barut, F. et al. Expression of heat shock protein 70 and endothelial nitric oxide synthase in placental tissue of preeclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pathol Res Pract* **206**, 651-656 (2010).
44. Lugin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R. & Liaudet, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem* **395**, 203-230 (2014).
45. Haneklaus, M. O'Neill, L.A. & Coll, R.C. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Curr Opin Immunol* **25**, 40-45 (2013).

46. Lamkanfi, M. & Dixit, V.M. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 137-161. 10.1146/annurev-cellbio-101011-155745 (2012).
47. Martinon, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol* **40**, 616-619 (2010).
48. Lamkanfi, M., Walle, L. V. & Kanneganti, T.D. Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunol rev* **243**, 163-173 (2011).
49. Moore, K.W, Malefity M.R., Coffman, R.L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765. 10.1146/annurev.immunol.19.1.683 (2001).
50. Harmon, A.C. et al. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci* **130**, 409-419 (2016).
51. Abdelaziz, D.H, Khalil, H., Cormet-Boyaka, E. & Amer, A.O. The cooperation between the autophagy machinery and the inflammasome to implement an appropriate innate immune response: do they regulate each other? *Immunol Rev* **265**, 194-204 (2015).
52. Lin, X. et al. Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy. *DNA Cell Biol* **32**, 220-227 (2013).
53. Harris, J. et al. Autophagy controls IL-1 $\beta$  secretion by targeting pro-IL-1 $\beta$  for degradation. *J Biol Chem* **286**, 9587-9597 (2011).
54. Burton, G.J., Yung, H.W. & Murray, A.J. Mitochondrial-Endoplasmic reticulum interactions in the trophoblast: Stress and senescence. *Placenta* **4.001**, 10.1016/placenta (2016).

55. Yu, J., Feng, L., Hu, Y., & Zhou, Y. Effects of SAC on oxidative stress and NO availability in placenta: potential benefits to preeclampsia. *Placenta* **33**, 487-494 (2012).
56. Matias, M.L.et al. Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in pregnant women with preeclampsia. *PLoS One* **10**:e0129095. (2015).
57. Larionov, A., Krause, A. & Miller, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **21**, 6:62, 10.1186/1471-2105-6-62 (2005).

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Grant No 2014/25611-5).

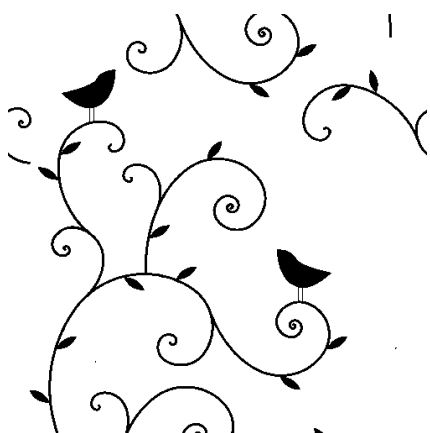
### **Author contributions**

M.T.P., L.D.O. and P.R.N. conceived and designed the experiments, P.R.N., M.R.V., M.L.M. and V.R.R. performed the experiments, P.R.N., M.T.P., M.R.V. and L.D.O. analyzed the data, P.R.N., L.D.O. and M.R.V. contributed reagents/materials/analysis tools, P.R.N., L.D.O. and M.T.P. wrote the paper, J.R.R., J.C.P and L.D.O. selected pregnant women.

### **Additional Information**

#### **Conflicts of interests:**

The authors state that they have no financial or commercial conflicts of interest.



*Anexos*

## **Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

***CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA “PAPEL DO FENÔMENO DE HIPÓXIA E REOXIGENAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DE microRNAs E AUTOFAGIA NO TECIDO PLACENTÁRIO” Subprojeto 1: Expressão de microRNAs em placenta, decídua e plasma de gestante normais e de portadoras de pré-eclâmpsia precoce Subprojeto 2: Efeito do estresse oxidativo sobre autofagia em tecido placentário***

Eu, \_\_\_\_\_, gestante, e atendida no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, fui convidada a participar da pesquisa para compor a lista de pacientes como grupo controle, por não possuir doença. O objetivo desta pesquisa é o de entender como a pré-eclâmpsia atua no organismo das gestantes, para isso é necessário entender como se desenvolve a gestação sem essa doença. Fui solicitada a doar pequena quantidade de sangue da veia do braço (10 mL), que será colhido com seringa e agulha descartável, uma única vez, no momento em que for atendida pelo médico e/ou será colhido um pedaço da placenta e decídua depois do parto. A decídua é um material que normalmente sai após o parto, junto com o sangue e a placenta e, portanto, não há problemas ao ser retirada. O convite para participar da pesquisa será feito na ausência de dor ou de qualquer sintoma que dificulte meu entendimento. Estou ciente de que a doação desse volume de sangue não me causará dor, a não ser a da picada da agulha no momento da coleta do sangue e, raramente, a formação de um pequeno hematoma no local. Fui informada que não terei benefícios direto com a pesquisa, mas que o resultado desse exame poderá ser enviado para mim, caso eu tenha interesse em obtê-lo. Fui informada também que eu posso, a qualquer momento, esclarecer dúvidas e desistir de participar da pesquisa, sem prejuízo do atendimento médico que necessitar e, que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados. Estou ciente de que, caso eu seja menor de idade, este termo de consentimento deverá ser assinado por mim e pelo meu responsável. Assim, concordo em participar da pesquisa. Obs: Você receberá uma cópia deste documento. Informações adicionais poderão ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608 / 1609.

Botucatu, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário maior de 18 anos

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador  
11 anos

\_\_\_\_\_  
Assinatura da adolescente maior de

Pesquisadores:

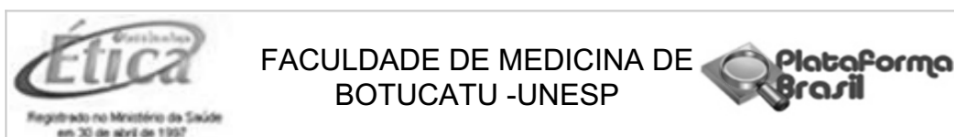
Leandro Gustavo de Oliveira – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP Fone: (14) 3811-6227

Maria Terezinha S. Peraçoli – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP Fone: (14)3880-0430

Priscila Rezeck Nunes – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP Fone: (14)3880-0431

Mariana Leticia Matias – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP Fone: (14)3880-0431

## **Anexo 2 - Parecer Inicial do Conselho de Ética em Pesquisa**



### **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

#### **DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Papel do fenômeno de hipóxia e reoxigenação sobre a expressão de microRNAs e autofagia no tecido placentário  
 Subprojeto 1: Expressão de microRNAs em placenta, decídua e plasma de gestantes normais e de portadoras de pré-eclâmpsia precoce  
 Subprojeto 2: Efeito do fenômeno de hipóxia e reoxigenação sobre a autofagia em tecido placentário

**Pesquisador:** Leandro Gustavo de Oliveira

**Área Temática:** Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):  
 (Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 1

**CAAE:** 37160614.5.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### **DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 855.529

**Data da Relatoria:** 02/11/2014

#### **Apresentação do Projeto:**

Os autores iniciam fazendo uma ampla revisão sobre a pre-eclâmpsia, sua importância do ponto de vista de saúde pública e a falta de informações, ainda hoje, sobre a sua etiopatogenia. Discorrem depois sobre os miRNAs, destacando que a participação de miRNAs no desenvolvimento da gestação normal e patológica encontra-se ainda em progresso, havendo trabalhos que apontam para o envolvimento de determinados miRNAs nos processos de implantação e desenvolvimento placentário. Entre os papéis desempenhados por esses miRNAs, destacam-se suas participações nos processos de angiogênese e resposta inflamatória. A partir do revisito, os autores propõem em linhas gerais a investigar o papel da hipóxia e reoxigenação sobre a expressão de microRNAs e autofagia no tecido placentário. Este projeto, na verdade se divide em dois subprojetos:

Subprojeto 1: Será realizado estudo transversal incluindo 60 gestantes, sendo 30 portadoras de pré-eclâmpsia precoce e 30 primigestas normotensas, que realizarem assistência ao parto na

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

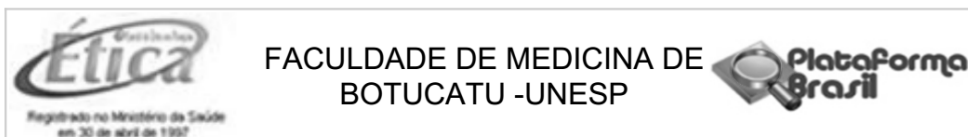
**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**CEP:** 18.618-970

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 855.529

Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. A finalidade acadêmica é uma dissertação de mestrado.

Subprojeto 2: Será realizado estudo transversal incluindo 20 primigestas normotensas, que realizarem assistência ao parto na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. A finalidade acadêmica é iniciação científica.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Investigar miRNAs envolvidos na resposta imune inata, inflamação e Equilíbrio angiogênico e lipídico em placenta, decídua e sangue periférico de gestantes normais e com pré-eclâmpsia.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos identificados pelos autores são:

Subprojeto 1: No momento da coleta de sangue pode haver dor da picada de agulha e formação de um pequeno hematoma no local.

Subprojeto 2: Não identifiquei risco na medida em que está prevista apenas a coleta da placenta (o que não oferece riscos a gestante, a não ser os riscos relativos ao parto e que não estão relacionados com a pesquisa)

Benefícios:

Os resultados do presente projeto contribuirão para um melhor conhecimento do mecanismo imunes envolvidos na fisiopatologia da PE e poderão, no futuro, estabelecer estratégias diferentes de prevenção e tratamentos dessa patologia obstétrica.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está muito bem apresentado e bem escrito. Tratando-se na verdade de dois subprojetos, um dos quais avaliará apenas tecido placentário e/ou decídua. O orçamento é próprio.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Contem todas as autorizações necessárias e suficientes para sua realização. O termo de consentimento está escrito na forma de convite e ha dois termos redigidos de maneira discretamente diferente para o grupo controle e para o grupo com pre-eclampsia.

#### **Recomendações:**

Sem recomendações.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto-mãe "Papel do fenômeno de hipóxia e reoxigenação sobre a expressão de microRNAs e

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

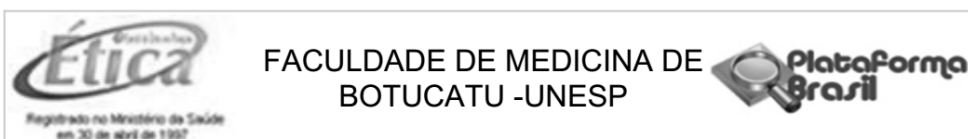
**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**CEP:** 18.618-970

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 855.529

autofagia no tecido placentário", o subprojeto 1: "Expressão de microRNAs em placenta, decídua e plasma de gestantes normais e de portadoras de pré-eclâmpsia precoce" e o subprojeto 2: "Efeito do fenômeno de hipóxia e reoxigenação sobre a autofagia em tecido placentário" foram aprovados, sem necessidade de envio ao CONEP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 03 de Novembro de 2014, sem necessidade de envio à CONEP.

Solicitamos aos pesquisadores que apresentem ao CEP o "Relatório Final de Atividades" dos sub-projetos ao final do estudo.

BOTUCATU, 03 de Novembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
 (Coordenador)

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

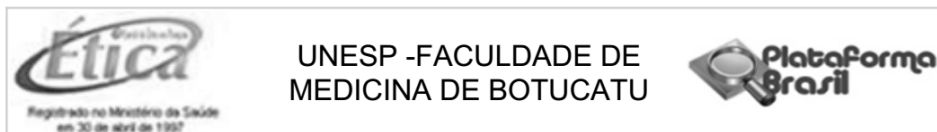
**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

### **Anexo 3 - Parecer do Conselho de Ética em Pesquisa (Emenda para alteração do título da pesquisa)**



#### **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

##### **DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Papel do fenômeno de hipóxia e reoxigenação sobre a expressão de microRNAs e autofagia no tecido placentário  
 Subprojeto 1: Expressão de microRNAs em placenta, decídua e plasma de gestantes normais e de portadoras de pré-eclâmpsia precoce  
 Subprojeto 2: Efeito do estresse oxidativo sobre autofagia em tecido placentário

**Pesquisador:** Leandro Gustavo de Oliveira

**Área Temática:** Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):  
 (Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 2

**CAAE:** 37160614.5.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### **DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.578.901

##### **Apresentação do Projeto:**

Tratam os autos de Projeto de Pesquisa (maior) "Papel do fenômeno de hipóxia e reoxigenação sobre a expressão de microRNAs e autofagia no tecido placentário", que contempla 2 Subprojetos.

É solicitada a alteração do título do Subprojeto II com a justificativa abaixo:

De: Efeito do fenômeno de hipóxia e reoxigenação sobre a autofagia em tecido placentário, a ser conduzido por Priscila Rezeck Nunes, orientada pelo Prof. Dr. Leandro Gustavo de Oliveira, co-orientada pela Profª. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Para: Efeito do estresse oxidativo sobre autofagia em tecido placentário a ser conduzido por Priscila Rezeck Nunes, orientada pelo Prof. Dr. Leandro Gustavo de Oliveira, co-orientada pela

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

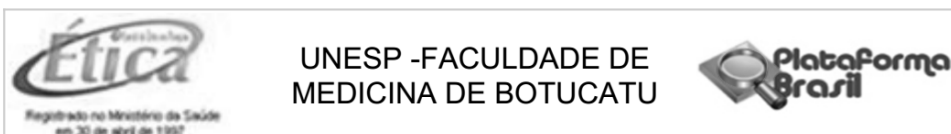
**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**CEP:** 18.618-970

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.578.901

Profª. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli.

Os motivos pelos quais a metodologia foi alterada devem-se ao fato de que o pedido FAPESP 2014/08444-8 foi denegado, impedindo que o grupo de pesquisa adquirisse como material permanente designado no processo uma câmara de hipóxia e reoxigenação, o que impediu que a aluna em questão realizasse o estudo envolvendo esse fenômeno.

**Objetivo da Pesquisa:**

Mudança do título de Subprojeto II:

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Constante do Parecer 855.529

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A justificativa apresentada pelos pesquisadores, estão coerentes para a presente solicitação.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não se aplica.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sugiro aprovação da mudança do título do Subprojeto II para: Efeito do estresse oxidativo sobre autofagia em tecido placentário a ser conduzido por Priscila Rezek Nunes, orientada pelo Prof. Dr. Leandro Gustavo de Oliveira, co-orientada pela Profª. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP em reunião de 06 de junho de 2016 APROVOU a mudança do título do Subprojeto II para: Efeito do estresse oxidativo sobre autofagia em tecido placentário a ser conduzido por Priscila Rezek Nunes, orientada pelo Prof. Dr. Leandro Gustavo de Oliveira, co-orientada pela Profª. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli, sem necessidade de envio à CONEP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                 | Arquivo                              | Postagem            | Autor | Situação |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------|-------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_709530 E1.pdf | 04/05/2016 16:49:58 |       | Aceito   |

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

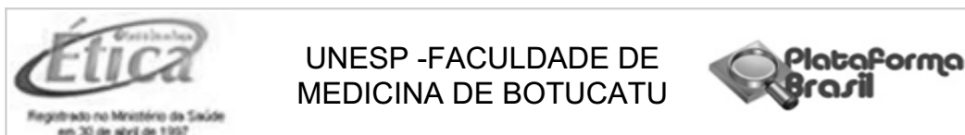
**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.578.901

|                                                           |                     |                     |                             |        |
|-----------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|--------|
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_PE.docx        | 04/05/2016 16:47:23 | Leandro Gustavo de Oliveira | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_GN.docx        | 04/05/2016 16:47:09 | Leandro Gustavo de Oliveira | Aceito |
| Folha de Rosto                                            | Folha_de_rosto.pdf  | 03/05/2016 16:56:47 | Leandro Gustavo de Oliveira | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Subprojeto_2.doc    | 03/05/2016 11:23:37 | Leandro Gustavo de Oliveira | Aceito |
| Outros                                                    | oficio_CEP.pdf      | 02/05/2016 16:48:32 | Leandro Gustavo de Oliveira | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projeto Leandro.pdf | 08/10/2014 14:36:30 |                             | Aceito |
| Outros                                                    | 001 (4).jpg         | 01/10/2014 14:46:43 |                             | Aceito |
| Outros                                                    | 001 (3).jpg         | 01/10/2014 14:05:20 |                             | Aceito |
| Outros                                                    | 001 (2).jpg         | 29/09/2014 13:23:21 |                             | Aceito |
| Outros                                                    | 001.jpg             | 29/09/2014 13:23:05 |                             | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Subprojeto 1.pdf    | 26/09/2014 10:02:19 |                             | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 07 de Junho de 2016

Assinado por:  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
 (Coordenador)

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n**Bairro:** Rubião Junior**CEP:** 18.618-970**UF:** SP**Município:** BOTUCATU**Telefone:** (14)3880-1608**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

# Anexo 4 – Comprovante de Encaminhamento para Publicação

12/01/2017

Scientific Reports



manuscripttrackingsystem

SCIENTIFIC REPORTS

[tracking system home](#)

[author instructions](#)

[reviewer instructions](#)

[help](#)

[tips](#)

[logout](#)

[journal home](#)

|                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Manuscript #</b>                 | SREP-17-01645                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Current Revision #</b>           | 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Submission Date</b>              | 11th January 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Current Stage</b>                | Quality Check Started                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Title</b>                        | Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress induces autophagy and inflammasome activation in placental explants                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Manuscript Type</b>              | Original Research                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Corresponding Author</b>         | Prof. Leandro De Oliveira (leandrogo@fmb.unesp.br) (Botucatu Medical School, São Paulo State University)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Contributing Authors</b>         | Miss Priscila Nunes , Prof. Maria Terezinha Peracoli , Mrs. Mariana Romao-Veiga , Miss Mariana Leticia Matias , Miss Vanessa Ribeiro , Prof. Jose Carlos Peracoli , Dr. Jose Ricardo Rodrigues                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Authorship</b>                   | Yes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Abstract</b>                     | The placenta is a multifunctional organ that can suffer with imbalances between pro-oxidant and antioxidant molecules. Autophagy is a self-degradative process responsible for removing damaged organelles and proteins from the cytoplasm. It has a role on reduction of inflammation by regulating inflammasome activation, an essential complex for pro-inflammatory cytokine production. The aim of this study was to evaluate whether hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) -mediated oxidative stress may induce autophagy and inflammasome activation on placental explants. Cultures were performed in different concentrations of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and cell viability was determined in order to define the best culture duration for the experiment. Protein levels of catalase, Hsp70 and IL-10 as well as gene expressions of LC3-II and IL-10 were higher in cultures without H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exposure. Concentrations of SOD, hCG and TNF-α and the IL-1β gene expression were higher in 100μM of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Gene expressions of beclin-1, p62 and TNF-α and IL-1β protein levels were elevated in cultures exposed to 1000μM of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . The concentration of 1000μM of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> led to inflammasome activation, identified by increasing gene expression of NLRP3 and caspase-1. Our results confirm that H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induces oxidative stress on placental tissue and demonstrate that cell responses to this stress involve autophagy and inflammasome activation. |
| <b>Techniques</b>                   | Life sciences techniques [Cell/tissue technologies]; Life sciences techniques, Cell/tissue technologies [Tissue culture]; Life sciences techniques [Gene expression analysis]; Life sciences techniques, Gene expression analysis [PCR-based techniques]; Life sciences techniques [Protein techniques]; Life sciences techniques, Protein techniques [Protein expression];                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Subject Terms</b>                | Biological sciences/Immunology/Inflammation/Inflammasome<br>Biological sciences/Immunology/Cytokines/Interleukins<br>Biological sciences/Immunology/Cytokines/Tumour-necrosis factors<br>Biological sciences/Cell biology/Autophagy/Macroautophagy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Competing Financial Interest</b> | There is <b>NO</b> Competing Interest.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Applicable Funding Source</b>    | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Nunes]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Nunes]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Peracoli]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Romao-Veiga]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Matias]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Ribeiro]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Peracoli]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [Rodrigues]<br>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation) - 2014/25611-5 [De Oliveira]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Manuscript Items

12/01/2017

Scientific Reports

1. Author Cover Letter [PDF \(32KB\)](#) [Source File \(DOC\) 2191KB](#)
2. Merged File containing manuscript text and 6 Figure files. [PDF \(1346KB\)](#)
  - a. Article File [PDF \(87KB\)](#) [Source File \(DOC\) 163KB](#)
  - b. Figure 1 [PDF \(59KB\)](#) [Source File \(TIF\) 204KB](#)
  - c. Figure 2 [PDF \(289KB\)](#) [Source File \(TIF\) 4204KB](#)
  - d. Figure 3 [PDF \(171KB\)](#) [Source File \(TIF\) 3004KB](#)
  - e. Figure 4 [PDF \(326KB\)](#) [Source File \(TIF\) 5458KB](#)
  - f. Figure 5 [PDF \(160KB\)](#) [Source File \(TIF\) 2816KB](#)
  - g. Figure 6 [PDF \(258KB\)](#) [Source File \(TIF\) 4007KB](#)

**More Manuscript Info and Tools**[Send Manuscript Correspondence](#)[Check Status](#)[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#) | [terms of use](#)