



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Mayk Ricardo dos Santos

Proteína Anexina A1: modulação em placentas de gestantes com diagnóstico de Diabetes Mellitus Gestacional

São José do Rio Preto
2021

Mayk Ricardo dos Santos

Proteína Anexina A1: modulação em placentas de gestantes com diagnóstico de Diabetes Mellitus Gestacional

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: CAPES (nº 88882.434451/2019-01) e FAPESP (2019/19949-7)

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Oliani
Coorientadora: Profa. Dra. Jusciéle Brogin Moreli

São José do Rio Preto
2021

S237p Santos, Mayk Ricardo dos
Proteína Anexina A1: modulação em placentas de gestantes com diagnóstico de Diabetes Mellitus Gestacional / Mayk Ricardo dos Santos. -- São José do Rio Preto, 2021
61 f. : il., tabs., fotos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Sonia Maria Oliani
Coorientadora: Jusciéle Brogin Moreli
1. Histologia. 2. Anexina A1. 3. Placenta. 4. Diabetes gestacional. 5. Danos ao DNA.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Mayk Ricardo dos Santos

Proteína Anexina A1: modulação em placentas de gestantes com diagnóstico de Diabetes Mellitus Gestacional

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES (nº 88882.434451/2019-01) e FAPESP (nº 2019/19949-7)

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Sonia Maria Oliani
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Marina de Paula Silva
KLC - King's College London

Profa. Dra. Rejane Maira Góes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
08 de setembro de 2021

Aos meus ancestrais, por me trazerem até aqui, e aos meus avós: Maria, que tem a força de todas as Marias do mundo quando o assunto é lutar pelo bem das pessoas que ama, e Zé Preto, que mesmo após a morte me ensina a não ter medo de nada. Peço licença para compartilhar essa conquista com vocês.

Aos meus pais, Rose e Cícero, que são meus exemplos de força, coragem e resiliência, sempre me apoiaram e lutaram contra suas próprias dificuldades, sem questionar, para que eu pudesse ter a melhor educação possível. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, que me orientou durante todo o processo, me fez enxergar a ciência com outros olhos, e me mostrou em cada fala e cada ação o caminho para ser um excelente pesquisador, assim como ela. Agradeço termos opiniões por vezes tão divergentes, pois isso fortaleceu ainda mais os ensinamentos e minha caminhada até o encerramento deste ciclo. Obrigado pelas broncas, elogios e por ser um exemplo de liderança e sucesso profissional.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Jusciéle Brogin Moreli, pela paciência, pelas trocas de conhecimentos, discussões e aprendizados durante o desenvolvimento deste trabalho, e por sempre acreditar no meu potencial.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido (Processo nº 2019/19949-7).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 - Proc. 88882.434451/2019-01.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), em especial ao Departamento de Biologia, pela permissão do uso de suas dependências durante a realização desse trabalho, e ao Programa de Pós Graduação em Biociências, por possibilitar o desenvolvimento do mesmo.

Às queridas parceiras do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Rafaela, Stefanie, Luana, Juliana, Moniele, e Profa. Dra. Flavia Lisoni. Obrigado por toda ajuda com o projeto, mas também pelas válidas discussões nas reuniões virtuais, pelos cafés, e reflexões sobre a carreira e a vida. Fazer pesquisa nesse momento de pandemia tem sido extremamente desafiador, e ter pessoas como vocês que incentivam e continuam lutando pela ciência é uma motivação necessária. Agradeço, em especial, a Stefanie, que se tornou uma grande amiga pra vida toda, sempre trazendo esperança com sua visão otimista, força de vontade e qualidade de trabalho impecável.

A todos os amigos que tive o privilégio de conhecer durante a graduação e que, desde então, acompanham minha jornada pessoal e profissional, especialmente à Gabriela, Amanda, André, Márcio, Aline, Matheus, Thaís, Lucas e Raquel. Cada um de vocês, em algum momento, contribuiu para que essa caminhada fosse mais leve e foram refúgio em meio às várias crises de ansiedade.

Às minhas irmãs, Layana e Laysa, pessoas que eu amo e que me apoiam, e ao meu grande companheiro canino Luke, por ser meu parceiro durante a pandemia, me esperar em frente ao portão todos os dias e me receber com o amor mais genuíno que existe.

Às Profas. Dras. Claudia Bonini, Patrícia Vilamaior e Lilian Casatti, que sempre me incentivaram e foram importantes na construção do professor que eu me tornei e do Mestre em Biociências que estou me tornando.

Ao Serviço Especializado de Diabete e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), em especial à Profa. Dra. Iracema de Mattos P. Calderon, pelo fornecimento do nosso objeto de estudo, as placentas humanas.

À Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, coordenadora do Laboratório Toxicologia Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, que forneceu as placentas de camundongos.

A todos os funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, em especial ao Erick Vivan, pela gentileza e ajuda constante.

Por fim, a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização desse trabalho.

“O inferno não são os outros, pequena Halla. Eles são o paraíso, porque um homem sozinho é apenas um animal.

A humanidade começa nos que te rodeiam, e não exatamente em ti. Ser-se pessoa implica a tua mãe, as nossas pessoas, um desconhecido ou a sua expectativa.

Sem ninguém no presente nem no futuro, o indivíduo pensa tão sem razão quanto pensam os peixes. Dura pelo engenho que tiver e perece como um atributo indiferenciado do planeta.

Perece como uma coisa qualquer.”

Valter Hugo Mãe – A desumanização (2017)

RESUMO

Ao longo da gestação, a placenta cria um microambiente no qual células geneticamente distintas permanecem em contato e equilíbrio funcional. No entanto, o Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) definido como qualquer grau de intolerância à glicose, iniciado ou detectado pela primeira vez na gestação, quando não tratado pode levar a resultados adversos maternos, placentários e, conseqüentemente, para o feto/recém-nascido. Nosso grupo de pesquisa tem investigado a proteína anti-inflamatória anexina A1 (ANXA1) em diferentes contextos gestacionais, incluindo placentas de gestações de risco, como aquelas associadas com as infecções por *Toxoplasma gondii* e *Zika vírus*. Com estas considerações, no presente trabalho foram avaliadas placentas de gestantes diabéticas (DMG) comparando com controles não diabéticos (ND) e, ainda, nas regiões do labirinto e zona juncional da placenta de camundongos BALB/c selvagens (WT) e nocautes para AnxA1 (*Anxa1* *-/-*) com o objetivo de consolidar os resultados obtidos nas placentas humanas. As placentas foram avaliadas histologicamente e a expressão da ANXA1 foi relacionada com a modulação dos marcadores de sobrevivência celular, na presença de dano ao DNA e apoptose. As expressões de ANXA1, danos ao DNA (8-Hidroxiguanosina e γ H2Ax), enzimas da via de reparo por excisão de base, BER, (OGG-1 e APE-1) e apoptose (caspase-3 clivada) foram detectadas por imunohistoquímica em vilos placentários humanos (região fetal da placenta) e nos animais (regiões do labirinto e zona juncional). A intensidade das expressões proteicas foi medida por densitometria citoplasmática, e pela relação de núcleos marcados por área vilosa. Histopatologicamente, as placentas DMG apresentaram alterações estruturais como desorganização das células trofoblásticas, predomínio de nós sinciciais e regiões fibrinoides. A expressão da ANXA1 foi reduzida no sinciciotrofoblasto viloso, enquanto ocorreu aumento no dano ao DNA, diminuição da expressão das enzimas envolvidas no BER e aumento do processo de apoptose. Resultados semelhantes foram observados nos camundongos *Anxa1* *-/-*, confirmando o papel da proteína ANXA1 na resposta celular placentária. Em conjunto, nossos dados sugerem que a ANXA1 nuclear tem envolvimento com o DNA danificado, modulando a resposta celular no DMG. Este fato pode representar um avanço nas investigações relacionadas com os mecanismos envolvidos na biologia placentária, e conseqüente prevenção dos resultados perinatais adversos nas gestações de risco.

Palavras-chave: Anexina A1 nuclear. Vilos placentários. Danos ao DNA. Reparo por excisão de base (BER). Morte celular.

ABSTRACT

Throughout pregnancy, the placenta creates a microenvironment in which genetically distinct cells remain in contact and functional balance. However, Gestational Diabetes Mellitus (GDM), defined as any degree of glucose intolerance initiated or first detected in gestation, when untreated may lead to adverse outcomes for mother and fetus/newborn. Our research group has investigated the annexin A1 anti-inflammatory protein (ANXA1) in different models of inflammation, including placentas from risk pregnancies, such as those associated with *Toxoplasma gondii* and *Zika virus* infections. With these considerations, in the present study, placentas from diabetic pregnant women (GDM) were compared with non-diabetic controls (DN), also in the labyrinth and junctional zone regions of the BALB/c mice placenta control (WT) and AnxA1-deficient (AnxA1 *-/-*) in order to consolidate the results obtained in human placentas. Placentas were analyzed histologically and ANXA1 expression was related to modulation of cell survival markers in the presence of DNA damage and apoptosis. ANXA1, DNA damage (8-Hydroxyguanosine and γ H2Ax), base excision repair pathway enzymes, BER, (OGG-1 and APE-1) and apoptosis (cleaved caspase-3) expressions were detected by immunohistochemistry in human placental villi (fetal region of the placenta) and in animals (maze regions and junctional zone). The intensity of protein expressions was measured by cytoplasmic densitometry, and by the ratio of nuclei marked by villous area. Histopathologically, GDM placentas showed structural changes such as disorganization of trophoblastic cells, predominance of syncytial nodes and fibrinoid regions. ANXA1 expression was reduced in villous syncytiotrophoblast, while there was an increased in DNA damage, a decrease in the expression of enzymes involved in BER and an increase apoptosis process. Similar results were observed in AnxA1 *-/-* mice, confirming the role of the ANXA1 protein in this placental cell response. Our observations of human material, in combination with animal *knockout* model, may open important perspectives for further understanding of ANXA1 as a cell damage marker in the presence of GDM. This fact may represent an advance in investigations related to the mechanisms involved in placental biology, and consequent prevention of adverse perinatal outcomes in high-risk pregnancies.

Keywords: Nuclear Annexin A1. Placental villi. DNA damage. Base excision repair (BER). Cell death.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fases iniciais do desenvolvimento placentário.....	13
Figura 2 - Desenvolvimento das vilosidades placentárias.....	14
Figura 3 - Representação macroscópica da placenta humana.....	15
Figura 4 - Remodelação das artérias espiraladas.....	16
Figura 5 - Intercorrências na placenta relacionadas à hiperglicemia.....	18
Figura 6 - Resposta celular do reparo por excisão de base (BER).....	21
Figura 7 - Consequências da hiperglicemia e inflamação para a célula.....	22
Figura 8 - Representação esquemática da ANXA1.....	23
Figura 9 - Diversas ações biológicas de ANXA1.....	24
Figura 10 - Histopatologia e imunomarcagem do trofoblasto em placentas de gestantes não diabéticas (ND) e diabéticas gestacionais (DMG).....	34
Figura 11 - Expressão proteica da ANXA1 nos vilos placentários.....	35
Figura 12 - Expressão dos marcadores de dano oxidativo (8-hidroxioguanosina) e dupla quebra de DNA (γ H2AX) nas vilosidades placentárias.....	36
Figura 13 - Expressão das enzimas de reparo de DNA (OGG-1 e APE-1) e do marcador de apoptose (caspase3-clivada) nas células dos vilos placentários	37
Figura 14 - Expressão dos marcadores de danos ao DNA em placentas de camundongo.....	38
Figura 15 - Expressão dos marcadores de reparo de DNA (BER) em placentas de camundongo.....	39
Figura 16 - Apoptose em camundongo.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Anticorpos para reações imuno-histoquímicas ou ensaio de Western Blot em placentas humanas.....	30
Tabela 2. Anticorpos para as reações imuno-histoquímicas em placentas de camundongos WT e Anxa1 -/-.....	32
Tabela 3- Dados clínicos maternos e do recém nascido.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
ANXA1	Anexina A1
ND	Não Diabéticas
WT	camundongos selvagens
Anxa1 -/-	camundongos nocautes para AnxA1
γH2Ax	gama H2Ax
BER	Reparo por Excisão de Base
OGG-1	8-Oxoguanosina DNA Glicosilase
APE-1	Endonuclease Apurínica/Apirimidínica
ST	Sinciciotrofoblasto
CT	Citotrofoblasto
EVT	Trofoblasto Extraviloso
RN	Recém nascido
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator De Crescimento Endotelial Vascular)
BCL-2	Linfoma de células B2
IL-1β, IL-10, IL-6	Interleucinas
TNF-α	<i>Alpha Tumor Necrosis Factor</i> (Fator De Necrose Tumoral Alfa)
MCP1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> (Proteína-1 Químioatraente De Monócitos)
INOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase Induzível)
CD68+	Cluster de diferenciação 68, antígeno marcador de macrófagos
EROs	Espécies reativas de oxigênio
NER	Reparo por excisão de nucleotídeo
MMR	<i>Mismatch Repair</i> (Reparo De Incompatibilidade De Dna)
POL-β	DNA polimerase β
FEN-1	Flap endonuclease 1
PLA2	Fosfolipase A2
cPLA2	Fosfolipase A2 citosólica
COX-2	ciclooxigenase 2
FPR	<i>Peptide Formyl Receptor</i> (Receptor De Formil Peptídeo)
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i> (Receptor De Glicocorticóide)

BAD	<i>Bcl-2-Associated Death Promoter</i> (Promotor De Morte Associado Ao Bcl-2)
PS	Fosfatidilserina
Ac2-26	Peptídeo da ANXA1
TTG	Teste de tolerância a glicose
HbA1c	Hemoglobina glicada
GM	Média glicêmica
IMC	Índice de massa corporal
TBS	Solução salina tamponada com tris
BSA	Albumina do soro bovino
DAB	Diaminobenzidina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS)
ECL	Quimioluminescência aprimorada
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
hrANXA1	Proteína ANXA1 recombinante humana
MCF7	células de adenocarcinoma mamário
SIRT3	Sirtuína-3 desacetilase mitocondrial dependente de NAD
H2O2	Peróxido de hidrogênio

LISTA DE SÍMBOLOS

kDA	Quilodalton
kg	Quilograma
g	Gramma
min	Minuto
µm	Micrômetro
rpm	Rotações por minuto
°C	Graus Celsius
µ²	Micrômetro quadrado
Kg/m²	Quilograma por metro quadrado
%	por cento

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1.	Placenta humana – Generalidades	13
1.2.	Desenvolvimento da placenta humana	14
1.3.	Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)	17
1.4.	DMG e placenta	18
1.5.	DMG, inflamação e estresse oxidativo	20
1.6.	Proteína anti-inflamatória Anexina A1 – relações com a placenta, danos ao DNA e resposta celular	22
2.	OBJETIVOS	27
2.1.	Objetivo geral	27
2.2.	Objetivos específicos	27
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.	RESULTADOS	33
4.1.	Dados clínicos maternos e perinatais	33
4.2.	Identificação histopatológica da placenta humana	33
4.3.	DMG modula a expressão de ANXA1 em placentas humanas	34
4.4.	Expressão dos marcadores de dano ao DNA em placentas DMG	36
4.5.	Expressão dos marcadores de resposta ao dano oxidativo e apoptose em placentas DMG	37
4.6.	ANXA1 modula a expressão dos marcadores de danos ao DNA e a resposta celular placentária em camundongos Anxa1 -/-	38
5.	DISCUSSÃO	41
6.	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO A - Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp (359/08)	56
	ANEXO B – Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, Hospital São Paulo - Unifesp-HSP (CAAE: 48609715.0.0000.5505)	57
	ANEXO C – CEUA (521)	61

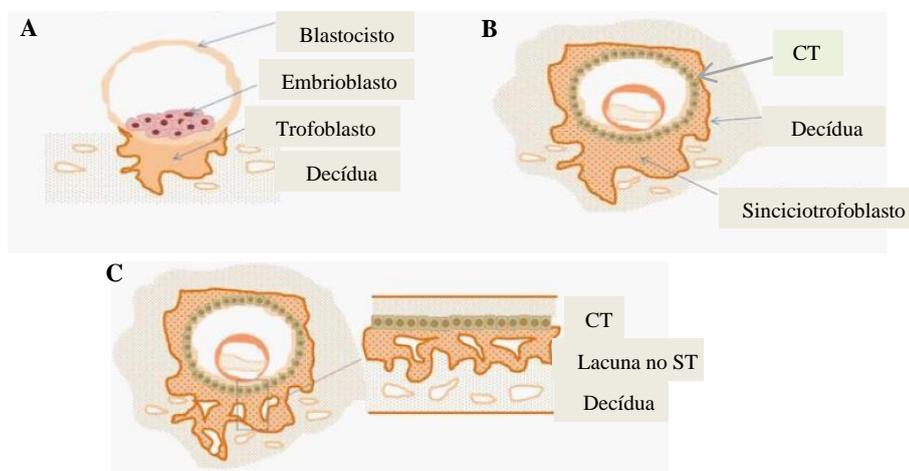
1. INTRODUÇÃO

1.1. Placenta humana – Generalidades

Ao longo da gestação, a interação entre tecidos maternos e fetais é realizada por meio de uma estrutura transitória, a placenta, que cria um microambiente no qual células geneticamente distintas se mantêm em contato e equilíbrio funcional (BURTON; JAUNIAUX, 2015; KNÖFLER et al., 2019). Este órgão possui estruturas de diferentes origens, morfologia e funções, desempenhando atividades funcionais da maioria dos órgãos fetais, desde o começo do desenvolvimento até o momento do parto (GUDMUNDSSON; DUBIEL; SLADKEVICIUS, 2009; RIQUELME, 2009).

Em humanos, a placenta é formada pelo cório frondoso (porção fetal) e a decídua basal (porção materna) (GUDMUNDSSON; DUBIEL; SLADKEVICIUS, 2009; RIQUELME, 2009). O desenvolvimento da placenta humana se inicia durante o processo de implantação, onde as células trofoblásticas do blastocisto proliferam e diferenciam, originando duas populações de células distintas: citotrofoblasto e sinciotrofoblasto (Figura 1). As células do citotrofoblasto possuem alta atividade proliferativa e dão origem ao sinciotrofoblasto por um mecanismo de fusão celular. Este, por sua vez, perde sua capacidade proliferativa e adquire uma capacidade invasiva que permite sua penetração na decídua (endométrio gravídico). Assim, o sinciotrofoblasto mantém contato direto com o tecido materno, sendo um componente-chave no estabelecimento da interface materno-fetal (HUPPERTZ et al., 2014; MOORE et al., 2016).

Figura 1: Fases iniciais do desenvolvimento placentário. [A] Implantação do blastocisto no endométrio (decídua). [B] Diferenciação do trofoblasto em sinciotrofoblasto (ST) e citotrofoblasto (CT). [C] Progressão da implantação com expansão do sinciotrofoblasto e formação das lacunas ocupadas por fluídos provenientes de secreções uterinas.



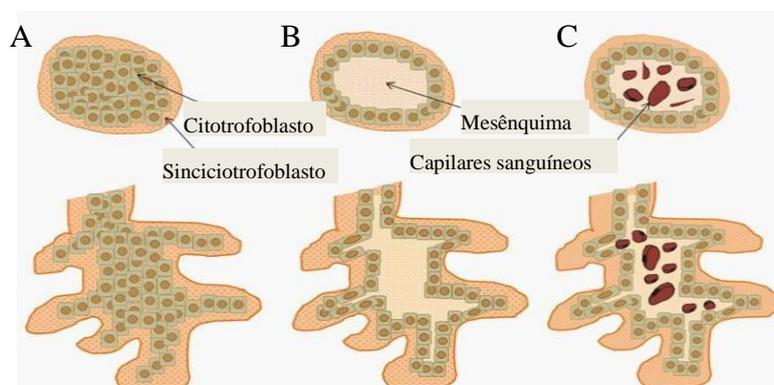
Fonte: adaptado de AVAGLIANO et al., 2016.

Placentas de humanos e camundongos são do tipo hemocorial, o que significa que o tecido trofoblástico - derivado do feto - é banhado diretamente em sangue materno (ENDERS; BLANKENSHIP, 1999). Os trofoblastos placentários regulam as trocas gasosas, o suprimento de nutrientes, a remoção de produtos residuais, o suporte hormonal e a defesa imunológica, todos estes aspectos são cruciais para o desenvolvimento e crescimento do feto eutério. Estas funções são orquestradas por meio da comunicação de sinais moleculares essenciais para a saúde da gravidez (SADOVSKY et al., 2020). Apesar das diferenças na estrutura da membrana placentária em ambas as espécies, elas compartilham consideráveis características celulares e moleculares, o que tornam os camundongos um objeto de estudo bastante utilizado nos aspectos da formação e função placentária (ADAMSON et al., 2002; SONCIN et al., 2015).

1.2. Desenvolvimento da placenta humana

Em paralelo à contínua formação do sinciciotrofoblasto, tem início a formação das vilosidades coriônicas, unidade placentária de trocas entre mãe e feto. As células do citotrofoblasto proliferam ocupando áreas centrais nas placas de sinciciotrofoblasto, formando estruturas em forma de colunas, os vilos primários (Figura 2A). Posteriormente, o mesoderma extra-embriônico migra para áreas centrais do citotrofoblasto, formando as vilosidades secundárias (mesoderma extra-embriônico + trofoblasto) (Figura 2B). O mesoderma extra-embriônico forma o estroma dos vilos coriônicos, com células mesenquimais, fibroblastos, miofibroblastos, células de Hofbauer e vasos fetais (Figura 2C) (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006; HUPPERTZ et al., 2014).

Figura 2: Desenvolvimento das vilosidades placentárias. [A] Vilosidade primária: citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto. [B] Vilosidade secundária: citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e mesoderma extra-embriônico e [C] Vilosidade terciária: citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto, mesoderma extra-embriônico e capilares sanguíneos, em cortes transversal (superior) e longitudinal (inferior).

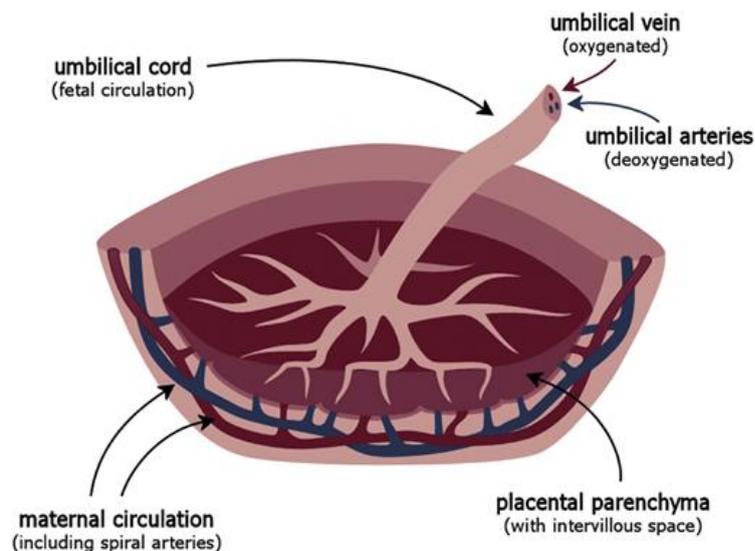


Fonte: adaptado de AVAGLIANO et al., 2016.

Existem dois tipos de vilosidades coriônicas: os vilos de ancoragem e flutuantes. Os vilos flutuantes ficam livremente banhados no sangue materno, estabelecendo as funções de trocas (nutrientes, gases e excreção) entre mãe e feto. Estas vilosidades coriônicas são formadas a partir da ramificação dos vilos de ancoragem. Estes, por sua vez, alcançam o endométrio e ancoram a porção fetal da placenta à decídua. Neste processo, as células do citotrofoblasto viloso proliferam intensamente na região apical, rompem a massa de sinciotrofoblasto e alcançam a decídua, formando colunas celulares que são direcionadas para as regiões mais internas do endométrio. Em conjunto, estas células recebem o nome de citotrofoblasto extraviloso e, também, são responsáveis pela interação materno-fetal, na medida em que interagem com diferentes tipos celulares maternos. (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003).

Na circulação materna o sangue oxigenado chega à placenta por meio das artérias espiraladas uterinas (Figura 3). O sangue arterial atinge a região intervilar (espaço formado entre os vilos coriônicos), mantendo contato direto com a camada de sinciotrofoblasto dos vilos, caracterizando assim a placentação hemocorial (MOORE; PERSAUD, 2008; SCHOOTS et al., 2018). Na circulação fetal o sangue fetal, pobre em oxigênio, chega pelas duas artérias umbilicais que se ramificam na placa coriônica para irrigar as árvores vilosas dos vasos coriônicos. O sangue oxigenado retorna à região da placa coriônica e feto por meio da veia umbilical (MOORE; PERSAUD, 2008).

Figura 3: Representação macroscópica da placenta humana. Os diferentes compartimentos por onde ocorrem as trocas entre mãe e feto na placenta são indicados: a circulação fetal, a circulação materna e o parênquima placentário/espaço intervilar.

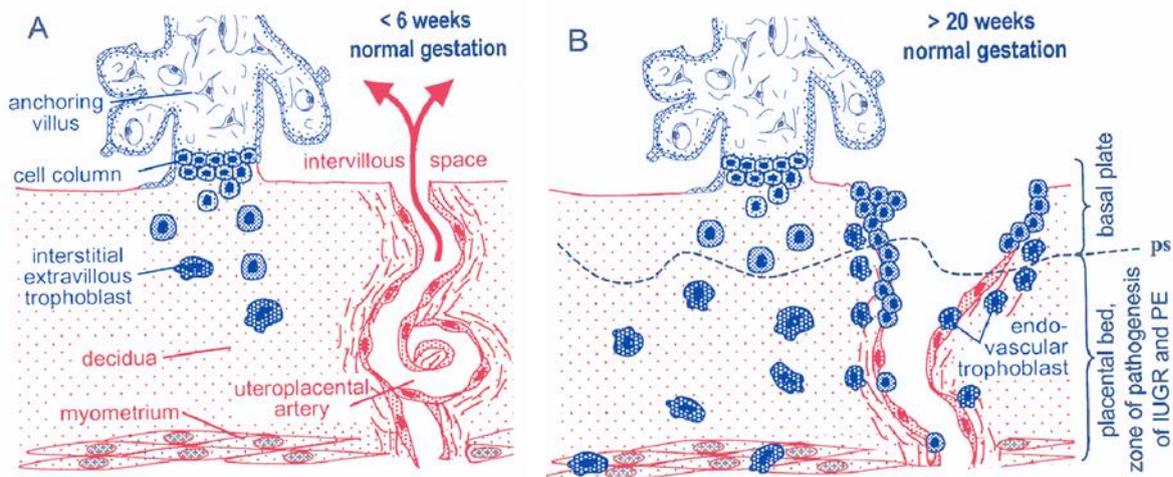


Fonte: SCHOOTS et al., 2018.

Para estabelecer uma função placentária saudável, o conceito precisa ser implantado adequadamente, seguido por uma invasão coordenada de trofoblastos extravilosos (EVT), resultando na remodelação das artérias espirais (Figura 4) e uma circulação de baixa resistência no espaço intervilloso (PEREIRA et al., 2015).

No início da gravidez, o fluxo sanguíneo materno ainda não está estabelecido no espaço intervilloso da placenta (SCHOOOTS et al., 2018). Um subconjunto das células EVT se diferenciara em células trofoblásticas endovasculares, transformando as artérias espirais em vasos dilatados oriundos da camada muscular, com amplo diâmetro. No entanto, esses vasos de grande diâmetro são obstruídos pela EVT no primeiro trimestre, restringindo assim o fluxo de sangue oxigenado na placenta em desenvolvimento, como é mostrado na figura 4. Isto resulta em baixa tensão de oxigênio no espaço intervilloso, o que é essencial para a embriogênese e organogênese normais. (BURTON; HUNG, 2003).

Figura 4: Remodelação das artérias espiraladas. A figura [A] mostra o início de uma gestação normal, onde o fluxo sanguíneo não está estabelecido. Observa-se a vilosidade ancorada na decidua, iniciando a invasão de células do trofoblasto extraviloso que se diferenciam em extraviloso intersticial. Com o avanço da gestação [B] os trofoblastos extravilosos intersticiais se diferenciam em trofoblasto extraviloso endovascular e se ligam à parede das artérias espiraladas, aumentando seu diâmetro e estabelecendo uma circulação placentária de baixa tensão de oxigênio.



Fonte: RED-HORSE et al., 2004.

As circulações fetal e materna estão separadas por tecidos extra fetais, constituindo a membrana placentária. Até aproximadamente 20 semanas, a membrana placentária consiste em quatro camadas: sinciotrofoblasto, citotrofoblasto, tecido conjuntivo das vilosidades (mesênquima) e endotélio dos capilares fetais. Após esse período, as células do citotrofoblasto praticamente desaparecem e a membrana placentária consiste em três camadas na maioria das

vilosidades, tornando-se marcadamente mais fina e atenuada (MOORE et al., 2016). Nesses sítios, o sinciotrofoblasto entra em contato direto com o endotélio dos capilares fetais para formar a membrana placentária vículo sincicial. Para estabelecer a formação das membranas, os sinciotrofoblastos se agrupam para formar nós sinciciais, diminuindo a distância para a troca gasosa (SCHROOTS et al., 2018).

A placenta atua como uma barreira natural entre as circulações sanguínea materna e fetal, com funções endócrinas e de transporte. Essas funções a tornam não apenas uma reguladora crucial da nutrição fetal, das trocas gasosas e tolerância imunológica materna, mas também alvo de alterações metabólicas maternas e/ou fetais associadas a patologias da gravidez (GAUSTER et al., 2012). Evidências recentes mostram que essas intercorrências na interface materno-fetal estão associadas com patologias na vida adulta, dentre elas diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, obesidade, asma e doenças alérgicas (TEDNER et al., 2012), o que reforça a importância de estudos dos mecanismos reguladores da interface materno-fetal.

1.3. Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)

O Brasil é o quarto país com maiores taxas de Diabetes Mellitus (DM) na população adulta, com um total de 14,3 milhões de pessoas de 20 a 79 anos com DM e gasto anual estimado em US\$ 21,8 bilhões. As estimativas populacionais de frequência de hiperglicemia na gestação no país são conflitantes, porém, estima-se que a prevalência do Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), no Sistema Único de Saúde, seja de aproximadamente 18%, utilizando-se os critérios diagnósticos atualmente propostos na literatura (REVISTA FEMINA, 2019; PEREIRA et al., 2019).

DMG é definido como qualquer grau de intolerância à glicose diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, sem nenhuma manifestação antes da gestação. O aumento progressivo da resistência à insulina na gestação e a redução da capacidade das células beta pancreáticas de secretar insulina são fatores importantes na patogênese da hiperglicemia materna, de qualquer tipo ou intensidade (ADA, 2021).

Em geral, os riscos específicos do DMG incluem aborto espontâneo, anomalias fetais, pré-eclâmpsia, morte fetal, macrossomia, hipoglicemia neonatal, hiperbilirrubinemia e síndrome da dificuldade respiratória neonatal, entre outros. Além disso, o diabetes gestacional pode aumentar o risco de obesidade, hipertensão e diabetes tipo 2 nos descendentes dessas mães (BOERSCHMANN et al., 2010; ADA, 2021). Por sua vez, essas mulheres também

apresentam risco aumentado de desenvolver DM futuro, síndrome metabólica e pré-eclampsia nas próximas gestações (NEGRATO et al., 2008; JOHNS et al., 2018).

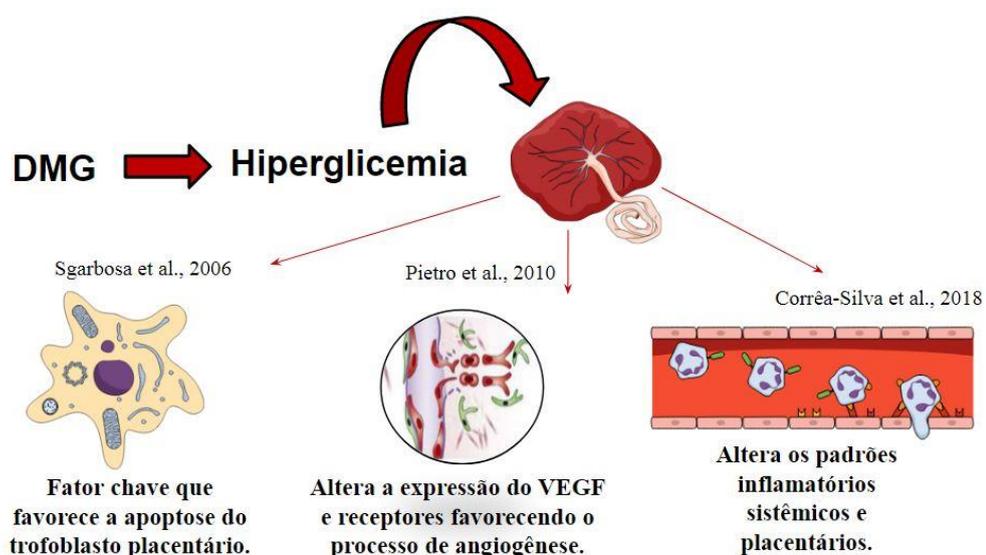
DMG está geralmente associada à hiperglicemia clínica, hiperlipidemia, hiperinsulinemia e disfunção endotelial placentária. Essas anormalidades levam ao comprometimento da função endotelial, inflamação vascular e hemostasia, que dão origem ao comprometimento da microcirculação, causando anormalidades na função placentária (KADIVAR et al., 2020).

1.4. DMG e placenta

A gestação é um período onde a glicemia é progressivamente aumentada, pois há uma resistência à insulina materna em decorrência da ação dos hormônios placentários diabetogênicos (lactogênio placentário, progesterona, cortisol e outros) sobre o organismo da mãe (ADA, 2021).

As placentas de gestantes com DMG sofrem alterações anatômicas e fisiológicas decorrentes da hiperglicemia, destacando as vasculares, apoptose e aumento de marcadores inflamatórios (Figura 5).

Figura 5: Intercorrências na placenta relacionadas à hiperglicemia. O DMG, quando não tratado, pode levar a resultados adversos na mãe e no recém-nascido (RN). Além das alterações no corpo materno e no RN, a placenta também sofre alterações decorrentes da hiperglicemia, como mostram os estudos. Estes indicam uma resposta da placenta à alteração da glicose sanguínea que pode ter consequências importantes para o feto.



Fontes: figuras adaptadas das publicações acima referidas.

Alterações morfológicas e histológicas são vistas em cerca de 30% das gestantes diabéticas e parecem estar associada à hiperglicemia (RUDGE et al., 2011). Investigações morfológicas clássicas, da estrutura da placenta, mostraram vários graus de alterações no sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, membrana basal trofoblástica e vasos fetais. Essas alterações dependem do período de gestação em que o insulto do ambiente diabético influencia a placenta (KADIVAR et al., 2020). Outras alterações foram relatadas, como o aumento dos nós sinciciais, a proliferação de células citotrofoblásticas, necrose fibrinoide e fibrose estromal, mostrando imaturidade das vilosidades ou alterações em sua ramificação (TARICCO et al., 2009).

Alterações no nível glicêmico também foram associadas ao processo de apoptose. Sgarbosa e colaboradores (2006) estudaram o equilíbrio entre apoptose e expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 na área das vilosidades de placentas a termo, provenientes de pacientes que apresentavam diferentes distúrbios hiperglicêmicos. A incidência de células apoptóticas foi maior nos grupos diabéticos em comparação com as mulheres grávidas normoglicêmicas. Além disso, foi encontrada diminuição no número médio de células imunopositivas para Bcl-2 nas vilosidades placentárias, o que sugeriu que a hiperglicemia pode ser um fator-chave na indução do processo de apoptose.

Estudos recentes mostram que o aumento dos níveis de glicose materna, durante a gravidez, promove aumento dos marcadores de estresse no retículo endoplasmático (YUNG et al., 2016; LORENZON et al., 2020), altera os padrões inflamatórios sistêmicos e placentários que ocorrem paralelamente à expressão de fatores do inflamassoma e, ainda, o processamento e secreção da citocina pró-inflamatória interleucina 1 beta - IL-1 β (MORELI et al., 2015; CORRÊA-SILVA et al., 2018). O predomínio do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) sobre interleucina 10 (IL-10), o aumento dos componentes do inflamassoma, níveis elevados de interleucina 6 (IL-6), da proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP1), da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e do número de células de Hofbauer (CD68+) foram observados em placentas com DMG. A ativação do inflamassoma, como uma possível fonte de fatores inflamatórios, pode ser um alvo importante a ser considerado no desenvolvimento da hiperglicemia e na prevenção de resultados adversos na gravidez (MORELI et al., 2015; CORRÊA-SILVA et al., 2018).

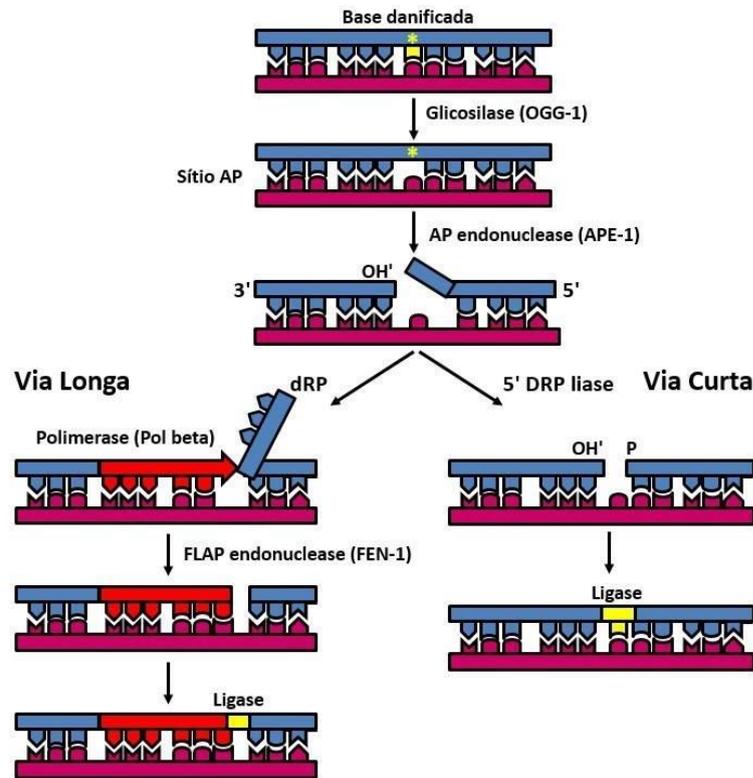
1.5. DMG, inflamação e estresse oxidativo

A inflamação é um processo inicial para várias doenças e parece ter papel causal na etiologia da DMG devido ao aumento da glicotoxicidade e resistência à insulina atribuídas à algumas moléculas inflamatórias, como a IL-1 β (ALENCAR, 2015). No entanto, também pode ser consequência da hiperglicemia decorrente dessa patologia, uma vez que gera um estado de inflamação crônica, caracterizado pela produção anormal de citocinas e ativação de vias de sinalização relacionadas à inflamação (DAHER et al., 2011). Algumas das principais citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento do DMG são a adiponectina, leptina, IL-1 β , IL-6 e TNF - α , e seus níveis podem estar aumentados como resultado do estresse oxidativo e das alterações inflamatórias, ambos induzidas pela hiperglicemia (MORELI et al., 2015; BRINK; VAN DER LELY; VAN DER LINDEN, 2016).

O estresse oxidativo, mediado pela hiperglicemia, induz lesão no DNA - como sítios abásicos, quebras de fita simples e quebras de fita dupla - e oxidam suas bases, especialmente a guanina. (JACKSON; BARTEK 2009; MORELI et al., 2014; BOKHARI; SHARMA 2019). Para compensar os danos que ocorrem ao DNA, as células desenvolveram vários mecanismos de reparo, em que cada um corrige diferentes tipos de lesões. Os mecanismos de reparo por excisão de nucleotídeo (NER), excisão da base (BER) e o *mismatch repair* (MMR) são os mais comuns envolvidos na correção das lesões de DNA (SOULIOTIS et al., 2020). Dentre esses mecanismos, o BER é o mais estudado e relacionado aos danos causados pelo estresse oxidativo, sendo o principal mecanismo envolvido na remoção das lesões de DNA nuclear e o único mecanismo de reparo existente na mitocôndria (Figura 6). Ele é capaz de remover sítios abásicos, bases oxidadas e quebra de fita simples (JACKSON; BARTEK, 2009; VISNES et al., 2018).

Inicialmente ocorre o reconhecimento e remoção da base pelas DNA glicosilases (8-oxoguanina- OGG1). A remoção da base gera um sítio abásico que é reconhecido pelas AP-endonucleases (apurínico/apirimidínico endonuclease 1 - APE1), enzimas responsáveis pela formação de uma lacuna após incisão em uma das extremidades do sítio abásico. Essa lacuna pode ser preenchida por uma via curta ou longa. Na via curta a APE-1 interage com a DNA polimerase β (POL- β), levando a síntese de um único nucleotídeo, enquanto na via rápida interage com uma flap endonuclease (FEN-1), que sintetiza uma cadeia de 2 a 10 nucleotídeos. Ambos os processos finalizam com a atividade de ligase da DNA ligase (AGNEZ-LIMA et al., 2012; WHITAKER et al., 2017; VISNES et al., 2018).

Figura 6. Resposta celular do reparo por excisão de base (BER). Via do mecanismo de reparo, mostrando as enzimas responsáveis e seus locais de ação.



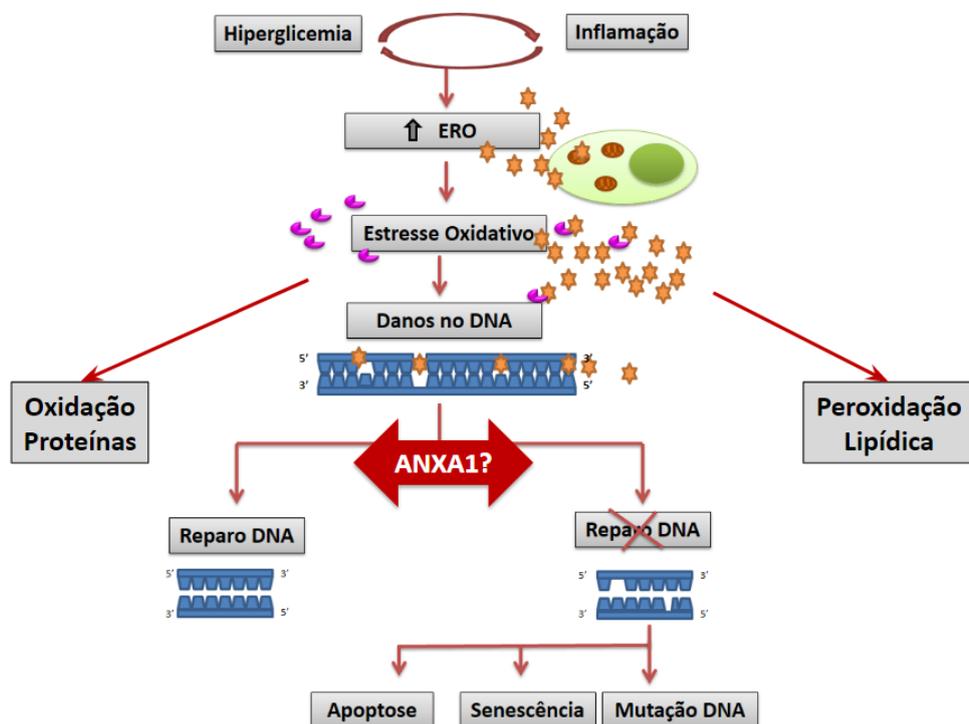
Fonte: adaptado Liu et al., 2007.

Quando o dano ao DNA excede a capacidade celular de repará-lo, o acúmulo de erros pode sobrecarregar a célula, resultando em apoptose, senescência celular ou fixação de mutações no genoma (MORELI et al., 2014; MURATA, 2018). A apoptose das células da placenta foi descrita em gestações com diabetes (SGARBOSA et al., 2006), bem como aumento da inflamação (MORELI et al., 2015; CORRÊA-SILVA et al., 2018) e estresse oxidativo (MYATT; CUI, 2004).

Investigações recentes sugerem que as condições hiperglicêmicas mediadas pelo DMG estão associadas à inflamação, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que estão envolvidas nas vias de sinalização celular, contribuindo, por exemplo, para a invasão do trofoblasto e desenvolvimento vascular na placenta (JAUNIAUX; POSTON; BURTON, 2006; HOCH et al., 2019). O aumento das EROs pode levar ao estresse oxidativo que, por sua vez, estimula a geração de mediadores inflamatórios (HOCH et al., 2019). Essa interação entre diabetes, estresse oxidativo e inflamação é amplamente explorada como um fator chave nas complicações relacionadas à hiperglicemia (Figura 7), incluindo alterações nas funções placentárias, bem como alterações no desenvolvimento embrionário e fetal (SPADA et al., 2014; HOCH et al., 2019 ; BEDELL et al., 2021). Há evidências na

literatura de que a expressão nuclear da proteína anti-inflamatória anexina A1 (ANXA1) exerce uma função moduladora diretamente relacionada à sobrevivência celular em diferentes modelos experimentais (SU et al., 2010; HIRATA; CORCORAN; HIRATA, 2011; XIA et al., 2018; SULIMAN et al., 2021).

Figura 7: Consequências da hiperglicemia e inflamação celular. Ambas as condições podem promover a formação de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo, que induz a oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e danos ao DNA. Tanto as proteínas quanto os lipídios podem ser removidos, mas o DNA precisa ser reparado por mecanismos que podem remover esse dano. Nossa hipótese é que a proteína ANXA1 pode estar exercendo uma função moduladora diretamente relacionada à sobrevivência celular.



Fonte: adaptado de Moreli et al., 2014.

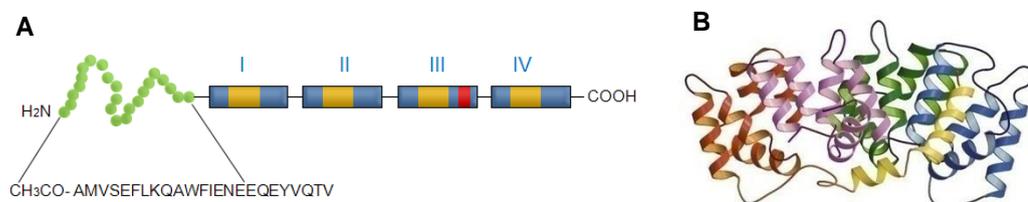
1.6. Proteína anti-inflamatória Anexina A1 – relações com a placenta, danos ao DNA e resposta celular

A Anexina A1, descrita no final da década de 1970, foi o primeiro membro caracterizado da superfamília das anexinas, proteínas que se anexam a membrana fosfolipídica de maneira dependente de cálcio e têm suas propriedades anti-inflamatórias reguladas por glicocorticoides, estando envolvida na inibição das sínteses de eicosanóides e fosfolipase A2 (PLA2) (FLOWER, 1988; PERRETTI; GAVINS, 2003).

Estruturalmente, apresenta um domínio C-terminal, que consiste em quatro repetições de 70 a 80 aminoácidos, altamente conservado entre as proteínas da superfamília das

anexinas, e responsável pela afinidade ao cálcio e ligação aos fosfolipídios (MUNN, MUES, 1986). O domínio N- terminal é a sequência anti-inflamatória da proteína, determinante de sua função e atividade biológica, e contém sítios para a mediação de processos pós-traducionais, tais como fosforilação, glicosilação e proteólise (RAYNAL, POLLARD, 1994; PERRETTI; FLOWER, 2004) (Figura 8). O gene da ANXA1 humana está localizado no cromossomo 9 (9q12-21.2) e codifica uma proteína de 37 kDa.

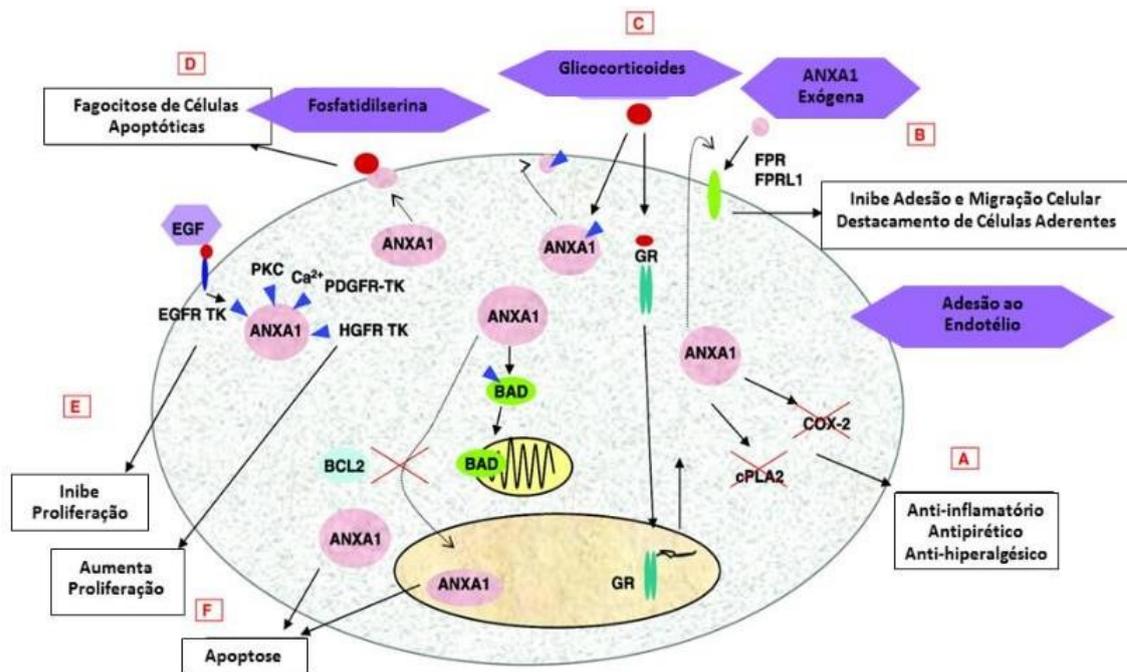
Figura 8: Representação esquemática da ANXA1. Estrutura primária da proteína, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo Ac2-26) [A]. Ilustração do arranjo tridimensional dessa proteína [B].



Fonte: RESCHER e GERKE, 2004.

A expressão da ANXA1 vem sendo observada especialmente em células relacionadas aos processos de defesa como neutrófilos (OLIANI et al., 2001; STUQUI et al., 2015; SANCHES et al., 2021), mastócitos (OLIANI et al., 2008; COSTA et al., 2018; PARISI; CORRÊA; GIL, 2019), eosinófilos (OLIANI et al., 2002; NG et al., 2011), monócitos (SOLITO et al., 2000; BERGSTRÖM et al., 2017; RIBEIRO et al., 2020) e linfócitos (D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008; HUANG et al., 2016; LIANG; LI, 2021). Esta proteína também atua como elemento regulatório de diversas funções e tipos celulares, tais como o bloqueio do extravasamento de leucócitos, indução de apoptose, modulação da expressão e secreção de citocinas, ativação e regulação de mastócitos, proliferação e sinalização celular (GIMENES et al., 2015; SUGIMOTO et al., 2016; DE PAULA-SILVA, 2016; TEIXEIRA et al., 2016; HAN et al., 2020). Além disso, sua ação protetora anti-inflamatória tem sido demonstrada em diversos modelos, como artrite, câncer, transplante heterólogo de pele, alergia ocular, epilepsia, lesão pulmonar e insuficiência cardíaca (GAVINS et al., 2007; FACIO et al., 2010; PATEL et al., 2012; LACERDA et al., 2018; CARDIN et al., 2019; MARMORATO et al., 2019; GIMENES et al., 2019; PRATES et al., 2020; ADEL et al., 2020; XU et al., 2021). Outras ações biológicas desta proteína podem ser observadas na figura abaixo.

Figura 9: Diversas ações biológicas de ANXA1. [A] Inibição da atividade da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) e cicloxigenase 2 (COX-2) com consequente efeito anti-inflamatório, antipirético e anti-hiperalgésico. [B] ANXA1 exógena atua sobre seu receptor de formil peptídeo (FPR) e lipoxina A4 (FPRL1, também chamado de ALX ou FPR2), para inibir a adesão, migração celular e desprendimento de células aderentes. [C] Aumento da expressão de ANXA1 com o tratamento de glicocorticoides e ação por meio receptor de glicocorticoide (GR), fato que contribui para sua atividade anti-inflamatória. Glicocorticoides podem também induzir a fosforilação rápida e translocação da ANXA1 para membrana celular. [D] ANXA1 é recrutada para a superfície celular, liga-se a fosfatidilserina (PS) e intercede no engolfamento de células apoptóticas. [E] ANXA1 pode ser fosforilada por uma série de quinases para aumentar ou diminuir a proliferação. [F] ANXA1 pode induzir a apoptose por meio da indução da desfosforilação do Promotor De Morte Associado Ao Bcl-2 (BAD), permitindo que BAD transloque para as mitocôndrias. Outra forma é a translocação da ANXA1 para o núcleo, que pode ser inibida pelo linfoma de células b2 (Bcl-2).



Fonte: adaptada de LIM e PERVAIZ, 2007.

A deficiência de ANXA1 também pode contribuir para etiologia de doenças inflamatórias (KOSICKA et al., 2013). Este estudo demonstrou que a concentração de ANXA1 está correlacionada inversamente com o índice de massa corpórea, percentual de gordura corporal total, relação cintura-quadril, níveis plasmáticos de proteína C reativa e leptina em seres humanos. Os resultados demonstram falha no sistema anti-inflamatório endógeno para responder a crescente inflamação sistêmica resultante da expansão do tecido adiposo, uma condição fortemente associada ao desenvolvimento do diabetes mellitus e das doenças cardiovasculares, sugerindo que a redução na ANXA1 plasmática contribui para o fenótipo de inflamação crônica observado na obesidade humana (KOSICKA et al., 2013).

Inicialmente, altos níveis de expressão de ANXA1 foram descritos no tecido uterino

humano, durante a gestação e no fluido seminal (SUN; LIU; GIBB, 1996), enquanto no âmnio e na placenta foram encontrados baixos níveis dessa proteína (MYATT; HIRTH; EVERSON, 1992). Placentas a termo de gestações normais apresentam maior expressão de ANXA1 quando comparadas às placentas de gestações de risco, como a Diabete Mellitus Gestacional (DMG), que apresentam níveis mais baixos da proteína e alto nível de citocinas inflamatórias (SHEIKH, SOLITO, 2018).

Recentemente, Hebeda e colaboradores (2020) sugeriram que a ANXA1 pode desempenhar um papel crucial na fase de implantação do blastocisto. O estudo observou que a proteína controla a inflamação que mantém o microambiente ideal para a implantação, e interage com os receptores de formil peptídeo (FPR) induzindo a sinalização necessária para ativar quinases e modular o citoesqueleto epitelial. Além disso, os pesquisadores identificaram que a ANXA1 também está relacionada com a interação dinâmica entre o epitélio uterino e o endotélio, crucial para a implantação do embrião, posterior decidualização e, conseqüentemente, gravidez bem-sucedida. Estudos do nosso grupo de pesquisa mostram que, na placenta, a proteína ANXA1 foi relacionada à redução da infecção por *Toxoplasma gondii* (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2018) e ao aumento da inflamação e desorganização tecidual na presença de *Zika vírus* (MOLÁS et al., 2020).

Investigações mostram que a ANXA1 é encontrada na membrana plasmática, no citoplasma e núcleo (OLIANI et al., 2001; MUSSUNOOR & MURRAY, 2008). A presença dessa proteína no compartimento nuclear foi relacionada com o desenvolvimento tumoral, e sua translocação do citoplasma para o núcleo ocorre em resposta a danos no DNA, estímulos proliferativos e associados à fosforilação (BOUDHRAA et al., 2016). A retenção nuclear da ANXA1 por mutações, em sítios específicos no sinal de exportação nuclear, resulta na diminuição da proliferação celular (ALVES et al., 2008).

Choi e colaboradores (2012) desenvolveram uma análise de rede integrativa para identificar proteínas que respondam ao inibidor de serina/treonina quinase (ATM), proteína com papel central na cascata de sinalização de danos no DNA, e as interações físicas com proteínas de reparo de DNA. Interessantemente, a análise identificou 53BP1 e ANXA1 como fortes candidatos. Complementando esses resultados, os autores demonstraram que linhagens celulares que não expressam a proteína ANXA1 são mais sensíveis aos danos ao DNA causados pela radiação ionizante.

Falhas no sistema celular em condições adversas prejudicam a função celular e, durante a gravidez, podem estar relacionadas a desfechos desfavoráveis para o recém-nascido. Analisando as diversas atividades biológicas descritas para ANXA1, especialmente no

controle da proliferação, apoptose e inflamação, investigar o papel da ANXA1 na biologia do trofoblasto e modulação de alguns marcadores relacionados à sobrevivência dessas células é de extrema relevância para a compreensão do desenvolvimento placentário normal e em doenças gestacionais como DMG. Aqui, nós avaliamos o papel potencial de ANXA1 na sobrevivência de células da placenta de mulheres grávidas com DMG e reforçamos nossos achados em modelo animal de camundongos AnxA1 -/-.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do estudo foi investigar o impacto do DMG na morfofisiologia placentária e avaliar a potencial ação da ANXA1 nuclear na modulação de marcadores relacionados com a sobrevivência celular.

2.2. Objetivos específicos

Investigar, nas vilosidades placentárias de gestantes não diabéticas (ND) e portadoras de DMG, os seguintes processos:

- ✓ Dados clínicos maternos e do recém nascido;
- ✓ Histopatologia;
- ✓ Imunolocalização de células trofoblásticas;
- ✓ Expressão e quantificação de ANXA1 nuclear e citoplasmática;
- ✓ Expressão e quantificação dos danos oxidativos e de dupla quebra das fitas de DNA;
- ✓ Expressão e quantificação das enzimas envolvidas na via de reparo por excisão de base;
- ✓ Morte celular por apoptose.

Avaliar, por imuno-histoquímica, placentas de camundongos WT e Anxa1^{-/-}, no que diz respeito à expressão dos danos e reparo de DNA, e apoptose, com o objetivo de consolidar os resultados obtidos nas placentas humanas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Placentas humanas

3.1.1. Caracterização da população e seleção das amostras

Este estudo transversal incluiu amostras de placenta de gestantes obtidas no Serviço de Diabetes e Gestantes da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, Brasil, aprovadas pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp (359/08 – ANEXO 1) e Universidade Federal de São Paulo, Hospital São Paulo - Unifesp-HSP (CAAE: 48609715.0.0000.5505 – ANEXO 2) . O termo de consentimento informado por escrito foi obtido de todos os sujeitos da pesquisa, de acordo com os princípios da Declaração de Helsinque. O diagnóstico de DMG foi realizado pelo teste de tolerância à glicose de 75 g (75 g-GTT), recomendado pela American Diabetes Association (ADA, 2020), entre a 24^a e 28^a semanas de gestação.

Um total de 12 amostras de placenta foram utilizadas neste estudo (n=6/grupo); não diabético (ND; normal 76g-GTT) e DMG (75g-GTT anormal). A caracterização da população de gestantes incluiu dados de idade, índice de massa corporal (IMC) no terceiro trimestre da gestação, ganho de peso durante a gestação, idade gestacional no parto, média glicêmica (GM) e níveis de hemoglobina glicada (HbA1c). O GM foi calculado a partir da média aritmética dos níveis de glicose plasmática medidos em todos os perfis de glicose realizados durante o tratamento (dieta ou dieta + insulina). Os níveis de glicose plasmática foram medidos pelo método da oxidase (Glucose Analyzer II Beckman, Fullerton, CA, EUA) e os níveis de HbA1c por cromatografia (cromatografia líquida de alta performance - D10™ Hemoglobin Testing System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O peso placentário e fetal também foram incluídos.

3.1.2. Critérios de inclusão

- a) ser classificada nos grupos definidos no delineamento do estudo;
- b) ter idade gestacional máxima de entrada no protocolo de tratamento de 30 semanas para as portadoras de DMG;
- c) realizar assistência pré-natal no Serviço da Faculdade de Medicina de Botucatu;
- d) assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.1.3. Critérios de exclusão

- a) tabagistas;
- b) etilistas;
- c) usuárias de drogas ilícitas;
- d) malformação fetal;
- e) gravidez gemelar;
- f) gestante em trabalho de parto.

3.1.4. Coleta das amostras do tecido placentário

Imediatamente após o parto, os cotilédones placentários da zona medial placentária foram coletados e a membrana âmniocoriônica retirada. Em seguida, os mesmos foram lavados com solução salina gelada. O excesso de líquido foi retirado com papel absorvente e, então, as porções materna e fetal foram dissecadas, fixadas ou congeladas para as análises do estudo. Os cotilédones com áreas necróticas, hemorrágicas ou calcificadas foram excluídos.

3.1.5. Processamento Histológico

Fragmentos de placentas, previamente coletados, foram fixados em paraformaldeído tamponado a 4%, por 24 horas em temperatura ambiente, desidratados em uma série crescente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Merck, Darmstadt, Germany). Cortes de 3µm deste material foram obtidos pelo micrótomo (Leica RM2265) do Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, para avaliações histológicas (coloração Hematoxilina-Eosina) e imuno-histoquímicas.

3.1.6. Imuno-histoquímicas

Os fragmentos placentários foram analisados para ANXA1, citoqueratina 7, marcador de dano oxidativo ao DNA (8 hidroxiguanosina), quebras de fita dupla de DNA (gama H2AX), enzimas de reparo de DNA (APE-1 e OGG1) e caspase-3 (Tabela 1). As amostras foram processadas em lâminas previamente silanizadas e, em seguida: (a) desparafinizadas e hidratadas em água por 5 minutos; (b) incubadas no banho maria em solução tampão citrato, pH 6,0, por 20 minutos a 96° C , para a recuperação antigênica; (c) lavadas em tampão tris-buffered saline (TBS) e deixadas em solução com peróxido de hidrogênio por 30 minutos (três lavagens de 10 minutos) para o bloqueio de peroxidase endógena; (d) lavadas com TBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (e) incubadas em solução de BSA a 10% em TBS, por 2 horas, a temperatura ambiente; (f) incubadas em câmara úmida a 37°C, com os

anticorpos primários diluídos em BSA; (g) lavadas com TBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (h) incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora; (i) lavadas com TBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (j) incubadas em substrato diaminobenzidina (DAB) por 2 minutos a temperatura ambiente, no escuro, para revelação (Kit DAB+CHROMOGEN DAKO); (k) lavadas em água destilada, contracoradas com Hematoxilina e montadas em lâminas com Entelan (Merck). Um total de 10 campos (40x) por amostra de placenta foram analisados. A intensidade da ANXA1 citoplasmática no trofoblasto viloso foi medida por densitometria. No total, 103 pontos aleatórios de cada placenta foram usados para análise densitométrica em uma escala arbitrária de 0 a 255. Núcleos celulares positivos para ANXA1, 8 hidroxiguanosina, γ H2AX, OGG1 e APE- foram contados, assim como células positivas para caspase-3 clivada. A área das vilosidades foi quantificada pelo software Image J (NIH, Maryland, EUA) em todos os campos e calculada a razão entre o número de células positivas (Caspase 3) ou núcleos positivos por área vilosa. Todas as análises foram conduzidas no microscópio Axioskop 2-Mot Plus (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), usando o software AxioVision.

Tabela 1. Anticorpos para as reações imuno-histoquímicas ou ensaio de *Western Blot* em placentas humanas.

Proteína	Anticorpo	Diluição	Empresa
Anexina A1	Anti ANXA1 - coelho	1:4000	Invitrogen
Caspase3	Anti-Caspase3 - coelho	1:100	Cell Signaling
APE-1	Anti-APE-1 - coelho	1:100	Novus Biologicals
8-Hidroxiguanosina	Anti-8 Hidroxiguanosina - camundongo	1:100	Abcam
Citoqueratina-7	Anti- citoqueratina7- camundongo	1:250	Dako
γH2AX	Anti- γ H2Ax - coelho	1:800	Novus Biologicals
OGG-1	Anti-OGG1 - coelho	1:100	Novus Biologicals

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.7. Obtenção do homogenato placentário

Fragmentos de tecido placentário humano congelado foram transferidos para tubos de propileno contendo tampão de lise (Merck, Darmstadt, Alemanha) e um coquetel de inibidores de protease (comprimidos de coquetel de inibidor de protease sem EDTA, Roche, Suíça). As amostras de placenta foram homogeneizadas usando um homogeneizador elétrico

em gelo. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 12.000rpm por 15min a 4 ° C. A concentração de proteína no sobrenadante foi medida usando um ensaio de proteína BCA (Pierce TM BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, EUA), e as amostras armazenadas em freezer a -80 ° C para ensaio de Western blot.

3.1.8. Western blot para ANXA1

A mesma quantidade de proteína total foi usada em todos os grupos. As proteínas foram separadas eletroforéticamente usando SDS-PAGE 15%, antes de serem transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Millipore, Massachusetts, EUA). A transferência foi confirmada pela coloração das membranas com solução *Ponceau S* a 10% (Sigma Aldrich, Missouri, EUA). As membranas transferidas foram bloqueadas com TBS-T-leite 3% por 1h e lavadas 3 vezes com tampão TBS. Em seguida, foram incubadas a 4° C com anti-βactina (1:2000; Novus Biologicals, Centennial, EUA) e anti-ANXA1 (1:5000; Invitrogen, Califórnia, EUA) em TBS-T-leite 3% durante a noite e lavado 3 vezes com tampão TBS. As membranas foram expostas a anticorpo conjugado com peroxidase de rábano (1:1000, Abcam, Cambridge, UK) em leite TBS-T a 3% por 1 h e lavadas 3 vezes com tampão TBS. Bandas imunorreativas (atividade da peroxidase) foram detectadas pelo método de quimioluminescência aprimorada (ECL), visualizado em filme fotográfico Hyperfilme. A análise quantitativa de ANXA1 foi medida por densitometria com o software Image J (NIH, Maryland, EUA). A β-actina foi usada como controle endógeno.

3.2. Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunomorfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto e, em colaboração com a Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, coordenadora do Laboratório de Toxicologia Celular e Molecular, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo. O presente estudo foi aprovado e conduzido de acordo com as normas do Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo 521 – ANEXO 3)

Camundongos BALB/c de 5-6 semanas de idade, machos e fêmeas do tipo selvagem (WT) e *Anxa1* *-/-* foram mantidos e reproduzidos no biotério da Escola de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Brasil). Comida (Nuvilab) e água estavam disponíveis *ad libitum* (sem dieta hiperglicêmica). Todos os animais foram alojados em uma sala com temperatura controlada (22–25 ° C e 70% de umidade) com um ciclo de luz escura de 12 horas. As fêmeas foram colocadas em gaiolas durante a noite com machos (3:1), e o

acasalamento bem-sucedido foi verificado na manhã seguinte pela presença de tampão vaginal (dia 0,5 de gravidez). No dia 18 de gravidez, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical ou foram anestesiados com xilazina e cetamina (7 mg / kg e 77 mg / kg, respectivamente; ip; Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) para a coleta de amostras de placenta (seis de cada grupo: WT e Anxa1 -/-), de acordo com Hebeda e colaboradores (2018). As placentas foram processadas para inclusão em parafina, coloração por Hematoxilina-Eosina e análises imuno-histoquímicas, conforme descrito nas placentas humanas (itens 2.1.3 e 2.1.4), nas seguintes diluições:

Tabela 2. Anticorpos para as reações imuno-histoquímicas em placentas de camundongos WT e Anxa1 -/-.

Proteína	Anticorpo	Diluição	Empresa
Caspase3	Anti-Caspase3 - coelho	1:100	Cell Signaling
APE-1	Anti-APE-1 - coelho	1:50	Novus Biologicals
8-Hidroxiguanosina	Anti-8 Hidroxiguanosina - camundongo	1:100	Abcam
γH2AX	Anti- γH2Ax - coelho	1:400	Novus Biologicals
OGG-1	Anti-OGG1 - coelho	1:100	Novus Biologicals

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3. Análises estatísticas

Os dados citados aqui são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para determinar se a distribuição dos dados era paramétrica ou não paramétrica. Em seguida, as diferenças entre os grupos foram avaliadas por teste t de Student. As análises foram realizadas no software GraphPad, versão 6.0, considerando o limite de significância estatística de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Dados clínicos maternos e perinatais

As gestantes do grupo DMG, embora tratadas com uma combinação de insulina e dieta, apresentaram aumento dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) quando comparadas ao grupo ND (Tabela 3). Entretanto, os valores estão dentro do preconizado pela ADA (2020), ou seja, hiperglicemia controlada. Ainda, os recém-nascidos do grupo DMG, apresentaram maior peso ao nascimento.

Tabela 3. Dados clínicos maternos e do recém nascido

	ND (n = 6)	DMG (n = 6)
Idade materna (anos)	30,85 ± 6,11	29,43 ± 5,36
IMC (Kg/m ²)	34,88 ± 8,44	38,05 ± 4,37
Ganho de peso (Kg)	12,83 ± 7,50	12,34 ± 6,94
Idade Gestacional (semanas)	38,88 ± 7,82	38,50 ± 9,50
HbA1c (%)	5,36 ± 0,63	6,32 ± 0,82*
Peso Placenta (g)	623,10 ± 78,38	632,5 ± 179,80
Peso RN (g)	3062,00 ± 276,60	3540,00 ± 574,50*

ND não diabético; DMG diabete melito gestacional, IMC: índice de massa corporal do terceiro trimestre de gestação; Idade gestacional no parto; HbA1c: Hemoglobina glicada do terceiro trimestre e Peso do recém-nascido (RN). Dados apresentados em média ± desvio padrão. *p<0,05.

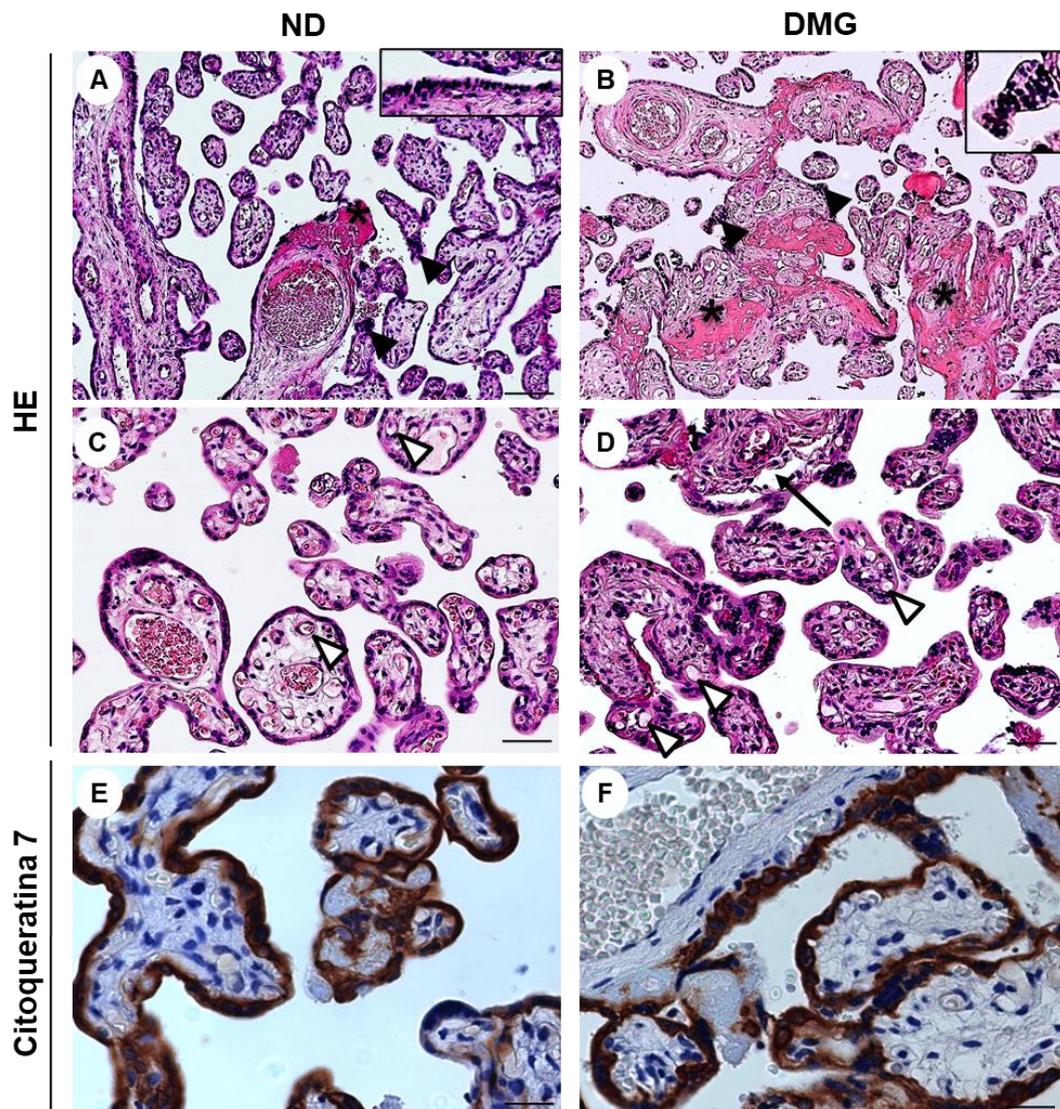
Fonte: elaborado pelo autor.

4.2. Identificação histopatológica da placenta humana

Nas condições controle (Figuras 10A e C) e DMG (Figuras 10B e D), identificamos os diferentes componentes dos vilos coriônicos. Nas vilosidades foi possível observar os nós sinciciais e o estroma rico em vasos sanguíneos fetais, além de outras células do tecido conjuntivo.

Nos vilos placentários do grupo DMG, ocorreu aumento dos nós sinciciais e depósitos de fibrina ao longo das vilosidades. Ainda, alterações na integridade do trofoblasto, caracterizadas pela desorganização e destacamento dessas células, quando comparadas com o grupo ND. A imunomarcagem com citoqueratina-7 foi utilizada para identificar as células do trofoblasto viloso (Figuras 10G e H).

Figura 10. Histopatologia e imunomarcção do trofoblasto em placentas de gestantes não diabéticas (ND) e diabéticas gestacionais (DMG). Caracterização dos vilos placentários nos grupos ND [A, C, E] e DMG [B, D, F]. Inserts destacam sinciciotrofoblasto [A] e nó sincicial [B]. Em DMG ocorreu predomínio de nós sinciciais (cabeças de seta preta) e regiões de depósitos de fibrina (asteriscos pretos). Presença de vasos sanguíneos (cabeças de seta brancas) nas placentas ND [C] e DMG [D], com predomínio de capilares e desorganização de células trofoblásticas (seta) nos vilos do grupo DMG. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: [A, B] 50 µm; [C, D] 20 µm . Imunomarcção com citoqueratina7 identifica trofoblasto viloso [E, F]. Contra-coloração: Hematoxilina. Barras: 20 µm. (n=6 placentas/grupo).



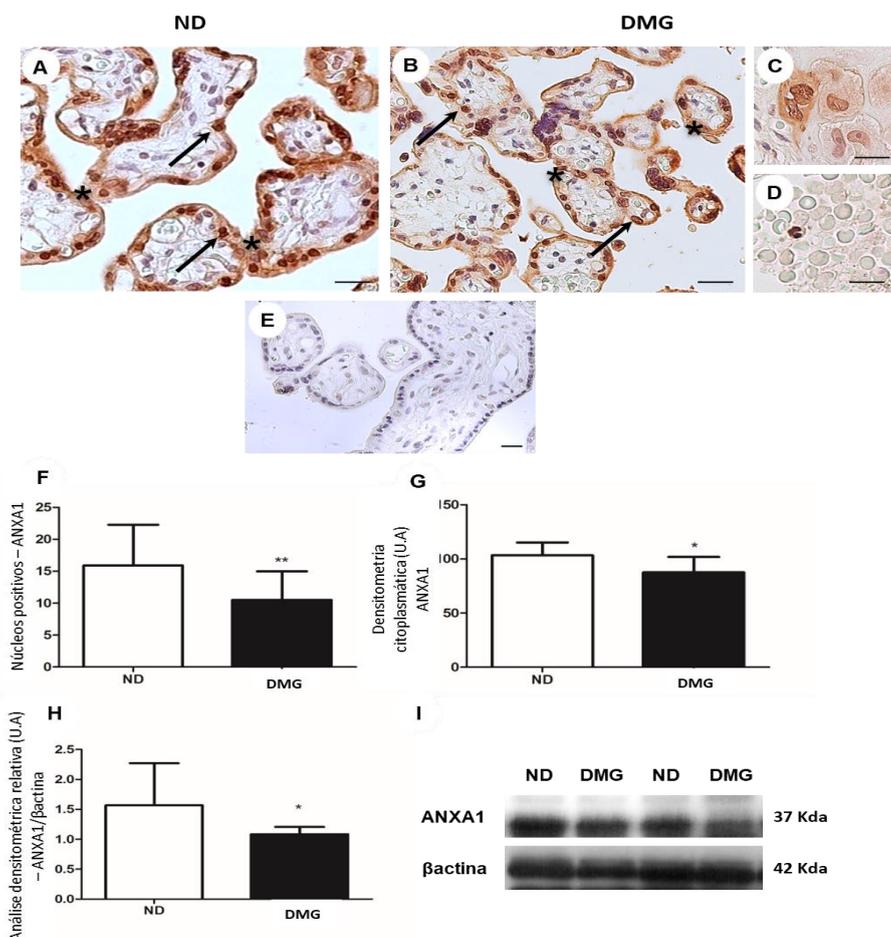
Fonte: elaborado pelo autor.

4.3. DMG modula a expressão de ANXA1 em placentas humanas

As análises da expressão proteica por reações imuno-histoquímicas e *Western blot* foram realizadas com o objetivo de verificar se a presença do DMG é capaz de modular a expressão placentária da ANXA1.

Nossas observações mostram que a proteína ANXA1 é expressa no núcleo e citoplasma do sinciciotrofoblasto nas placentas dos grupos ND e DMG (Figura 11). No entanto, ocorreu redução na sua expressão no sinciciotrofoblasto do grupo DMG, confirmada pelo menor número de núcleos positivos e densitometria citoplasmática (Figuras 11F e G). A proteína também foi detectada em células de Hofbauer e neutrófilos fetais no interior dos capilares dos vilos. A quantificação da expressão proteica da ANXA1 no homogenato placentário por *Western blot* (Figura 11H, I) confirma os resultados observados nas reações de imunohistoquímica.

Figura 11: Expressão proteica da ANXA1 nos vilos placentários. Imunorreatividade para ANXA1 detectada principalmente no núcleo (setas) e citoplasma (asteriscos) do sinciciotrofoblasto de placentas ND [A] e DMG [B]. Detalhes da expressão de ANXA1 nas células de Hofbauer [C] e neutrófilo fetal [D] no grupo DMG. Ausência de imunorreatividade no controle da reação [E]. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barras: [A-D]: 20 μ m. Quantificação: número de núcleos marcados por área ($10.000\mu^2$) para ANXA1 [F] e densitometria citoplasmática [G]. Representativo de *Western blot* ilustrando a expressão de ANXA1 em ND e DMG [H]. A intensidade relativa da banda foi normalizada com a beta actina [I]. Dados apresentados em média e desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (n=5 placentas/grupo).

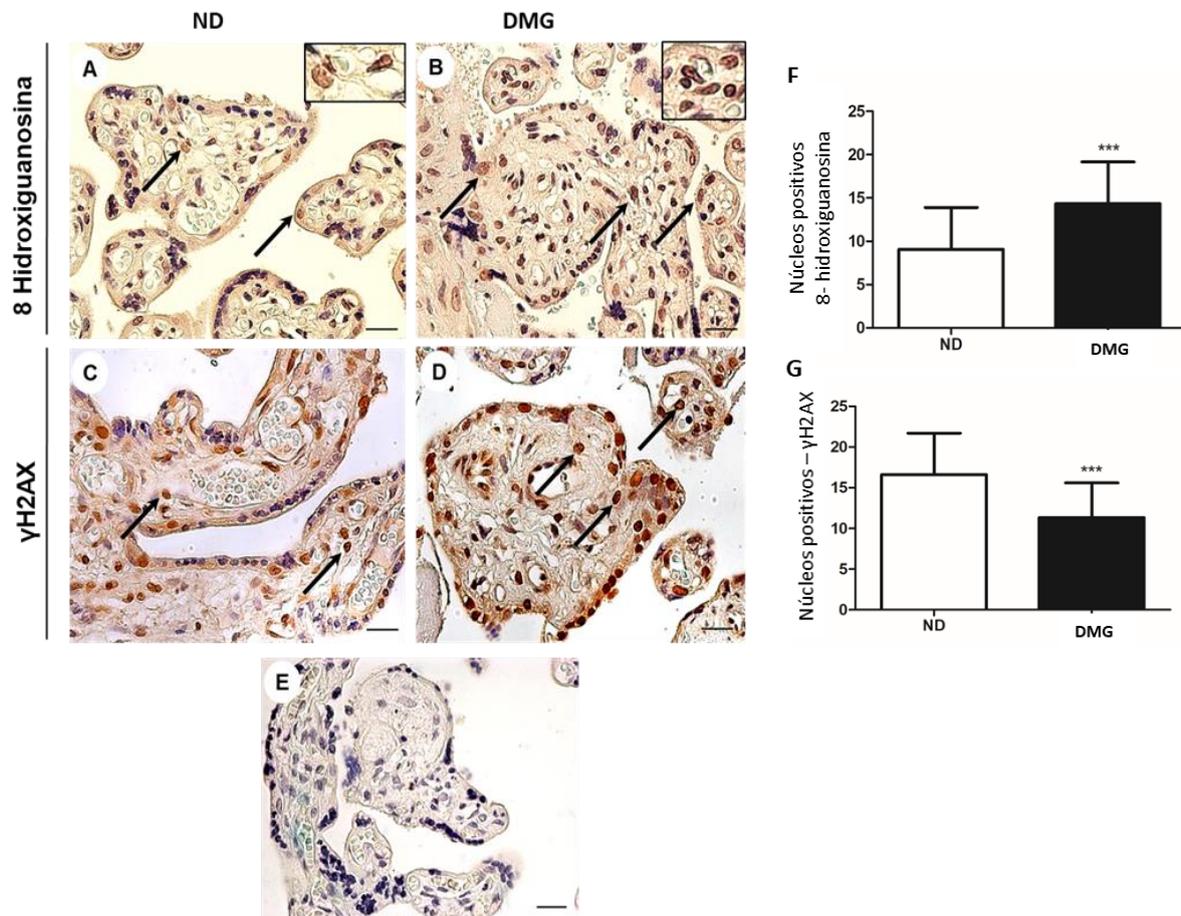


Fonte: elaborado pelo autor.

4.4. Expressão dos marcadores de dano ao DNA em placentas DMG

Para investigar se a presença do DMG está relacionada à danos ao DNA na placenta foi realizada análises imuno-histoquímicas para detecção dos danos oxidativo, 8-hidroxioguanosina (Figura 12A e B), e de dupla quebra na fita de DNA, γ H2AX (Figura 12C e D). Os vilos placentários das gestantes portadoras de DMG apresentaram aumento desses danos no sinciciotrofoblasto e nas células do estroma, quando comparadas com ND, dados confirmados pela quantificação dos núcleos marcados por área (Figura 12F e G).

Figura 12: Expressão dos marcadores de dano oxidativo (8-hidroxioguanosina) e dupla quebra de DNA (γ H2AX) nas vilosidades placentárias humanas. Imunorreatividade para 8-hidroxioguanosina [A, B] e γ H2AX [C, D] nos núcleos (setas) de células trofoblásticas e mesenquimais em ND e DMG. Detalhes mostrando imunorreatividade nos núcleos. Ausência de imunorreatividade no controle das reações [E]. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barras: 20 μ m. Quantificação: número de núcleos marcados por área (10.000 μ m²) para 8-hidroxioguanosina [F] e γ H2AX [G]. Dados apresentados como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$. (n=6 placentas/grupo).

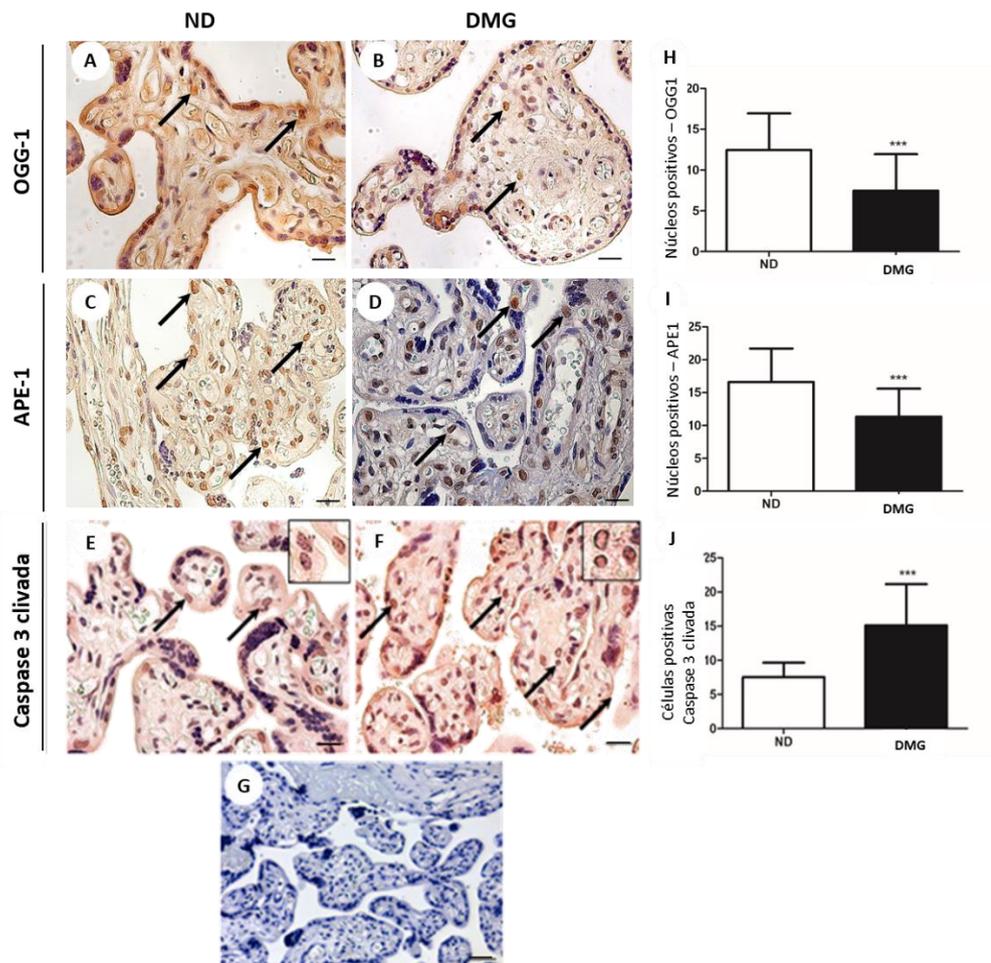


Fonte: elaborado pelo autor.

4.5. Expressão dos marcadores de resposta ao dano oxidativo e apoptose em placentas DMG

A expressão nuclear das enzimas de reparo da via BER, OGG-1 e APE-1, foi analisada em placentas humanas com o objetivo de avaliar a resposta das células vilosas placentárias ao aumento do dano oxidativo no DNA. As enzimas foram expressas no sinciciotrofoblasto e nas células mesenquimais dos grupos ND e DMG (Figura 13 A - D), embora com redução da expressão nuclear em DMG (Figura 13 H e I). Como consequência dessa redução, placentas do grupo DMG apresentaram aumento da reatividade para caspase 3 clivada (Figura 13 J), evidenciando aumento da apoptose no sinciciotrofoblasto e estroma viloso.

Figura 13. Expressão das enzimas de reparo de DNA (OGG-1 e APE-1) e do marcador de apoptose (caspase3 clivada) nas células dos vilos placentários. Imunorreatividade para OGG-1 [A, B], APE-1 [C, D] e caspase-3 clivada [E, F] nos núcleos (setas e detalhes) das células do sinciciotrofoblasto e estroma viloso, em gestantes ND e DMG. Ausência de imunorreatividade no controle das reações [G]. Número de núcleos marcados por área ($10.000\mu^2$) para OGG-1 [H] e APE-1 [I] e caspase-3 clivada [J]. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barras: 20 μ m. Dados apresentados em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$. (n=5 placentas/grupo).

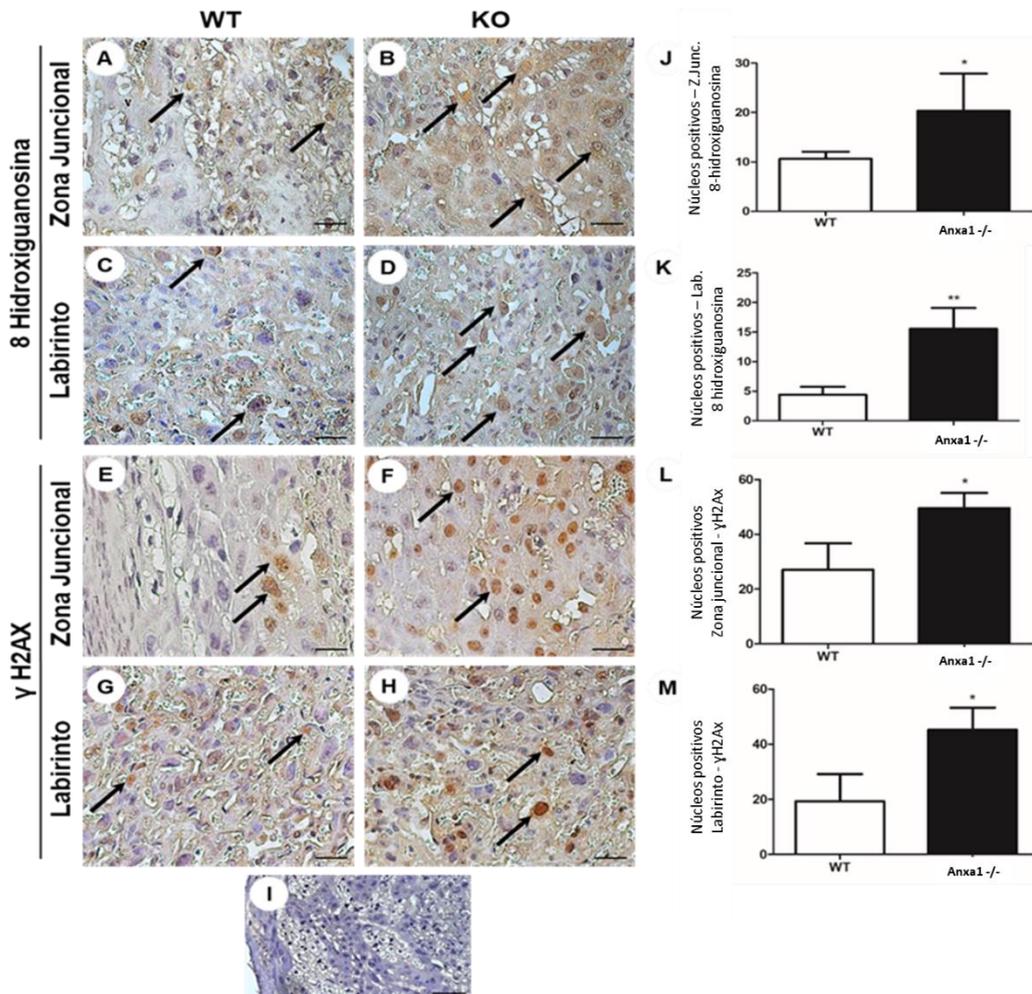


Fonte: elaborado pelo autor.

4.6. ANXA1 modula a expressão dos marcadores de danos ao DNA e a resposta celular placentária em camundongos *Anxa1*^{-/-}

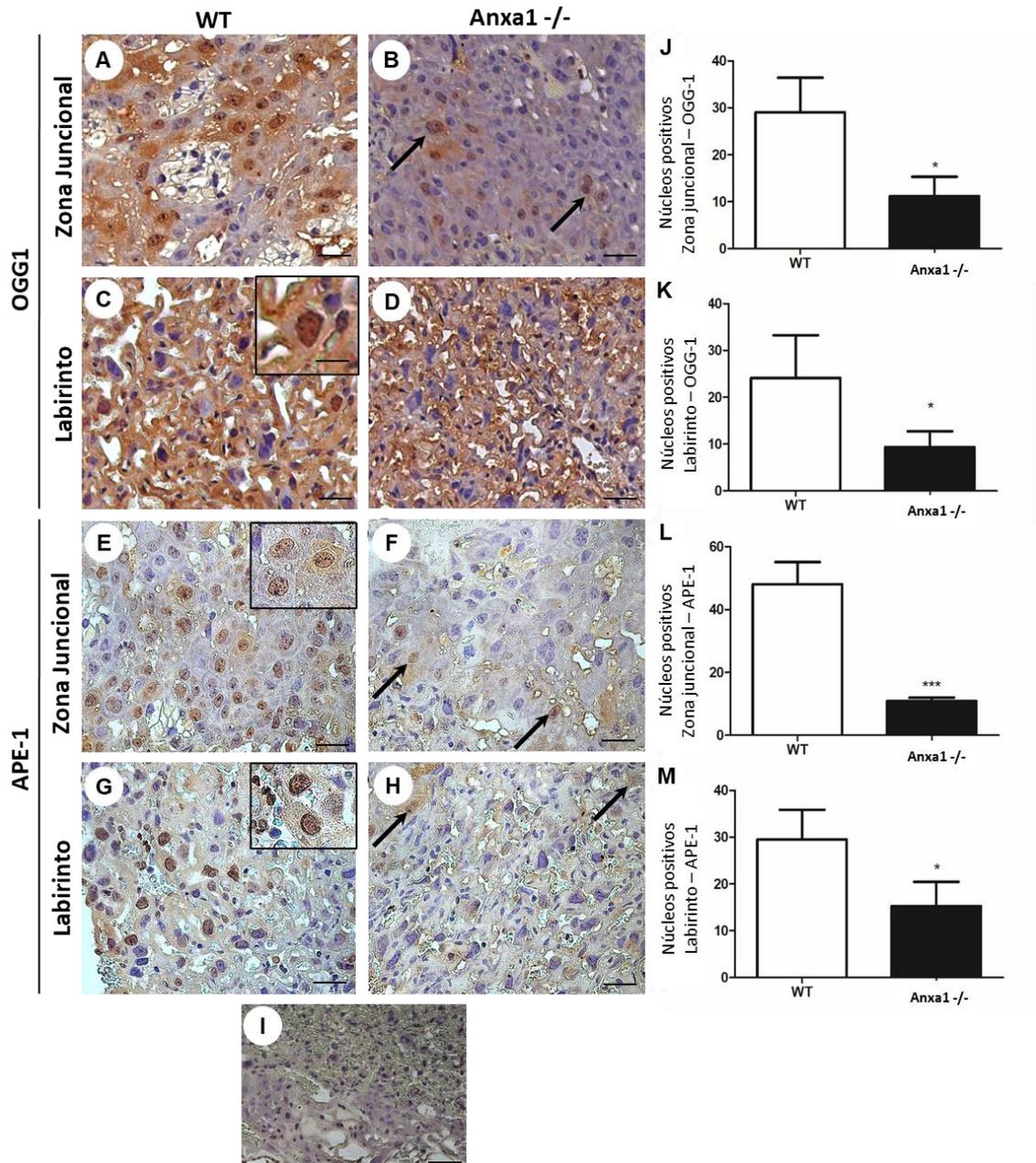
Para investigar a resposta celular placentária na ausência de ANXA1 foram realizadas análises imuno-histoquímicas para danos e reparo de DNA, nas regiões do labirinto e zona juncional, comparando camundongos WT e *Anxa1*^{-/-}, com o objetivo de consolidar os resultados obtidos nas placentas DMG. As placentas de camundongos *Anxa1*^{-/-} apresentaram aumento dos danos 8-hidroxoguanosina e γ H2AX (Figura 14), bem como redução das enzimas da via BER, OGG-1 e APE-1 (Figura 15). O processo de apoptose também foi avaliado nessas placentas (Figura 16) e os resultados mostram aumento da reatividade para caspase3 clivada no grupo *Anxa1*^{-/-} em relação ao WT.

Figura 14. Expressão dos marcadores de danos ao DNA em placentas de camundongo. Imunorreatividade para 8-hidroxiguanosina [A - D] e γ H2AX [E - H], nos núcleos celulares (setas) da zona juncional e labirinto de seções placentárias de animais WT e *Anxa1*^{-/-}. Ausência de imunorreatividade nos controles das reações [I]. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barras: 20 μ m. Análises quantitativas de núcleos positivos para 8-hidroxiguanosina na zona juncional [J] e labirinto [K], e γ H2AX – zona juncional [L] e labirinto [M], em 63,2 μ m². * p < 0,05; ** p < 0,01.



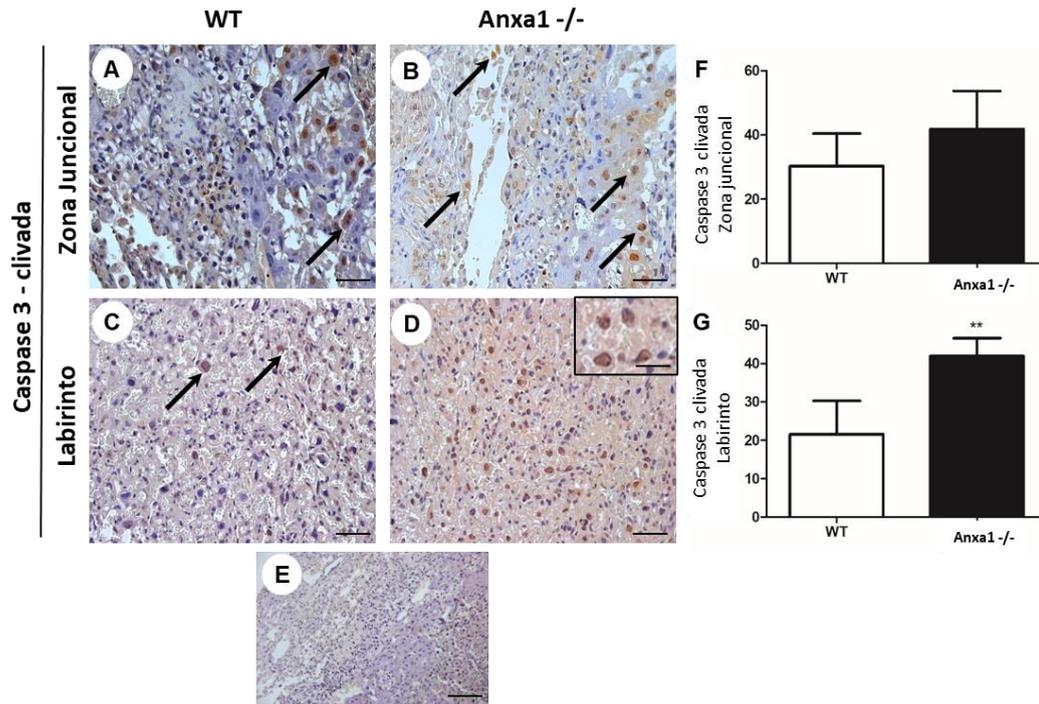
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15. Expressão dos marcadores de reparo de DNA (BER) em placentas de camundongo. Imunorreatividade para OGG-1 [A - D] e APE-1 [E - H], nos núcleos das células da zona juncional e labirinto. Detalhes mostrando núcleos positivos. Ausência de imunorreatividade no controle das reações [I]. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barras: 20 μ m. Análises quantitativas de núcleos positivos para OGG-1 na zona juncional [J] e labirinto [K], e APE-1 – zona juncional [L] e labirinto [M], em 63.2 μ^2 . Dados apresentados em média e desvio padrão. * $p < 0.05$; $p < 0,01$; *** $p < 0.001$ (n=6 placentas/grupo).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16. Apoptose em camundongos. Imunorreatividade para caspase 3 clivada na zona juncional [A, B] e labirinto [C, D] de seções de placentas de animais WT e *Anxa1*^{-/-}. Setas e detalhe mostram células positivas para caspase-3. Ausência de imunorreatividade em controles de reação [E]. Análises quantitativas de células positivas em 63,2 μ 2 [F, G]. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barras: 20 μ m. ** $p < 0,01$.



Fonte: elaborado pelo autor.

5. DISCUSSÃO

Investigações sobre os mecanismos relacionados com a fisiopatologia placentária são de fundamental importância e auxiliam no entendimento de complicações que podem comprometer a gestação e saúde embrio/fetal (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006; KNÖFLER et al., 2019). Na presente investigação, avaliando as placentas de gestantes portadoras de Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) e gestantes não diabéticas (ND), observamos que o DMG reduz a expressão da ANXA1 nuclear e enzimas de reparo de DNA e, ainda, aumenta os danos ao DNA e morte celular nas células fetais da placenta. O uso dos camundongos *knockout* para AnxA1 forneceu resultados semelhantes aos observados em placentas humanas DMG, confirmando o papel da proteína ANXA1 na resposta celular a esses danos de DNA em células placentárias.

Dados da literatura indicam que a hiperglicemia materna está associada com aumento dos níveis de HbA1c (ADA, 2020). Nossos dados clínicos revelam que gestantes do grupo DMG, embora tratadas com a combinação de insulina e dieta, apresentaram aumento dos níveis de HbA1c quando comparados ao controle ND, corroborando estudo de Renz e colaboradores (2015). O aporte exagerado de glicose da mãe para o feto resulta em aumento da produção de insulina fetal. Classicamente, a glicose é o substrato (KNOPP et al., 1970) e a insulina o hormônio de crescimento do feto (NAEYE, 1965). Nossos resultados confirmam os observados na literatura, sugerindo que a presença da DMG, mesmo com o tratamento adequado, está relacionado com aumento do peso observado nos recém-nascidos.

O grau de tolerância à glicose materna não influencia apenas os aspectos clínicos. Alterações na morfologia e fisiologia placentárias parece ser um fator comum a todos os tipos de desordens hiperglicêmicas, incluindo DMG, com prejuízo no transporte de nutrientes e oxigênio ao feto (ALENCAR, 2015). Histologicamente, nossos resultados qualitativos mostram que as vilosidades placentárias do grupo DMG apresentam alterações estruturais no trofoblasto, aumento de celularização e capilarização, além de maior predomínio de nós sinciciais e depósitos de fibrina, reforçando os dados descritos na literatura (TARICCO et al., 2009; EL SAWY et al., 2018). Calderon e colaboradores (2007) realizaram análises morfométricas de placentas expostas a diversos níveis de hiperglicemia mostrando que, em gestantes DMG e portadoras de diabetes mellitus tipo 1 (DM1) ou 2 (DM2), o tamanho, o número e a área total das vilosidades terminais eram semelhantes às placentas controle. No entanto, o índice de capilarização foi menor nas portadoras de DM1 e DM2 e intermediário no grupo DMG, demonstrando que a alteração na capilarização do vilos é proporcional no nível

glicêmico materno.

Placentas de gestantes DMG apresentam, ainda, outros processos que culminam em prejuízo funcional ao órgão e, conseqüentemente, ao feto, como estresse de retículo endoplasmático, inflamação e apoptose (SGARBOSA et al., 2006; MORELI et al., 2015; CORRÊA-SILVA et al., 2018; LORENZON et al., 2020). Vários pesquisadores, incluindo nosso grupo de pesquisa, têm demonstrado a ação da ANXA1 em diferentes modelos de inflamação, incluindo doenças inflamatórias crônicas, como a diabetes e obesidade (HEADLAND et al., 2015; MORELI et al., 2015; DE PAULA-SILVA et al., 2016; MOLÁS et al., 2017; LACERDA et al., 2018). Nossas análises com placentas DMG mostram ANXA1 expressa no núcleo e citoplasma do sinciciotrofoblasto, como descrito anteriormente por SUN e colaboradores (1996). Essa expressão é reduzida nas placentas de gestantes DMG, dados confirmados pela quantificação da imuno-histoquímica e no homogenato placentário por *Western blot*.

Um papel central no desenvolvimento fetal de gestações complicadas pela DMG pode ser atribuído à inflamação do tecido placentário (ALENCAR, 2015). Neste sentido, avaliar os resultados obtidos em placentas humanas e de animais *Anxa1* *-/-* pôde elucidar o papel dessa proteína, classicamente anti-inflamatória, no contexto gestacional. Camundongos *Anxa1* *-/-* exibem uma resposta inflamatória exagerada, caracterizada por aumento na migração de leucócitos e geração de IL-1 β , e resistência parcial ou completa aos efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticóides (ROVIEZZO et al., 2002). Em estudo relacionado com inflamações crônica e aguda foi observado um fenótipo inflamatório mais severo em camundongos *Anxa1* *-/-*, quando comparados aos controles WT (PATEL et al., 2012). Resultado semelhante foi encontrado em modelos de DM1 e 2, onde a deficiência dessa proteína em camundongos *Anxa1* *-/-*, alimentados com dieta rica em gordura, desenvolveu um fenótipo diabético mais grave, caracterizado por níveis elevados de glicose no sangue, níveis elevados de insulina e aumento no OGTT (PURVIS et al., 2019). Esses resultados sugerem que o aumento da ANXA1 circulante é um mecanismo compensatório para proteger os tecidos dos efeitos deletérios da hiperglicemia, e pode estar limitando o desenvolvimento da hiperglicemia de maneira independente de insulina.

A proteína ANXA1, além de mediar o processo inflamatório, está envolvida em importantes implicações fisiopatológicas, incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose e, muito desses processos estão relacionados com a resposta aos danos no DNA (SWA et al., 2012; VAGO et al., 2012; HAN et al., 2014). A localização nuclear dessa proteína tem sido pouco estudada e os resultados mostram que sua translocação para o núcleo

é promovida, dentre outras causas, pelo estresse oxidativo e outros agentes indutores de dano ao DNA (RHEE et al., 2000; HIRATA et al., 2014; PARK; LIM; BAEK, 2015). Nossos resultados obtidos de danos ao DNA em placentas humanas mostram aumento na expressão dos marcadores de dano oxidativo (8- hidroxoguanosina) e dupla quebra (γ H2AX) da fita de DNA no sinciciotrofoblasto e nas células mesenquimais, onde a expressão de ANXA1 nuclear é reduzida. Paralelamente, placentas de camundongos *Anxa1* *-/-* exibiram os mesmos resultados relacionados ao aumento de danos de DNA em células localizadas nas zonas juncional e labirinto. De acordo com SWA e colaboradores (2012), na ausência de *Anxa1*, camundongos *Anxa1* *-/-* demonstraram maior acúmulo de danos em relação aos WT, com resposta prejudicada a danos oxidativos, em células epiteliais da glândula mamária normal. A literatura indica que a quantificação da histona H2AX fosforilada (H2AX) corresponde a quebra dupla de DNA (MAH; EL-OSTA; KARAGIANNIS, 2010), e que a guanina oxidada (8-oxodG) possui grande importância biológica, pois é uma lesão mutagênica que induz as transversões da guanina para timina (MORELI et al., 2016; MARKKANEN, 2017), fato que demonstra a importância das análises desses marcadores de danos ao DNA.

Para sobreviver e manter a integridade do genoma, os organismos possuem mecanismos de reparo de DNA que atuam de forma eficaz para remoção dessas lesões (FRIEDBERG, 2003; BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006). Neste aspecto, nossos resultados indicaram que a placenta humana responde à DMG, com aumento dos danos oxidativos ao DNA e redução da expressão das enzimas de reparo da via BER, OGG-1 e APE- 1. Estes dados foram confirmados nas placentas dos animais *Anxa1* *-/-*, assim podemos propor o possível envolvimento da proteína ANXA1 nessa resposta celular placentária. Investigações anteriores, envolvendo danos de DNA e resposta celular, indicam que em células mononucleares do sangue periférico de gestantes com DMG, as enzimas da via BER foram reguladas negativamente, enquanto o dano ao DNA e os parâmetros de estresse oxidativo se acumulavam (MORELI et al., 2016). Diferentemente, os descendentes dessas gestantes apresentaram aumento da expressão dessas enzimas, com consequente prevenção dos danos ao DNA e morte celular (MORELI et al., 2014; MORELI et al., 2016).

Estudos quantitativos de proteômica indicam que a ANXA1 desempenha um papel potencial na resposta aos danos causados no DNA (SU et al., 2010). Análises de bioinformática, de proteínas reguladas negativamente pela ANXA1, revelaram que ela está potencialmente implicada na resposta a danos no DNA pois, quando associada a Yap1 (proteína regulada no cluster da via de resposta ao dano ao DNA), a superexpressão de ANXA1 resgata a resposta proliferativa em células epiteliais da glândula mamária de

camundongos *Anxa1*^{-/-} expostos ao dano oxidativo (SWA et al., 2012).

Quando o tipo e a quantidade de danos superam a capacidade de reparo das células, pode ser observado a consequência dos danos não reparados por acúmulo de mutações no genoma ou, ainda, por morte celular (COSTA et al., 2003; HUBLAROVA et al., 2010). De fato, nossa investigação mostra que as placentas de gestantes com DMG apresentam aumento de apoptose, como descrito previamente por Sgarbosa e colaboradores (2006). Os mesmos resultados obtidos de apoptose em placentas DMG foram detectados em placentas dos animais *Anxa1*^{-/-}. Apoptose e seus mecanismos reguladores associados são eventos fisiológicos cruciais para a manutenção da homeostase placentária e o desequilíbrio desses processos pode comprometer a função da placenta e, conseqüentemente, o sucesso da gravidez (SGARBOSA et al., 2006).

Nosso estudo aponta para a participação da ANXA1 nuclear nos processos relacionados aos danos do DNA, modulando a resposta celular. Na presença da DMG, essa interação é prejudicada levando ao processo de morte celular na placenta. De acordo com Xia e colaboradores (2018) o mecanismo e a função da migração nuclear de ANXA1, bem como os fatores que influenciam sua translocação, permanecem obscuros e são importantes para identificar como a ANXA1 desempenha seu papel como um "regulador nuclear" da sobrevivência celular.

Finalmente, os resultados obtidos indicam que a expressão diferencial da ANXA1 na placenta altera a resposta celular relacionada aos danos de DNA, pela redução da expressão das enzimas de reparo da via BER, OGG-1 e APE-1, e pela conseqüente indução do processo de apoptose nesse tecido. Estes achados, que foram confirmados no modelo experimental com animais *Anxa1*^{-/-}, demonstram a relevância da proteína na resposta celular placentária.

Em conjunto, nossos dados sugerem que a ANXA1 nuclear tem envolvimento com o DNA danificado, modulando a resposta celular. Na presença de hiperglicemia, essa interação é prejudicada levando ao processo de morte celular na placenta, com possíveis conseqüências funcionais a esse órgão. Assim, a ANXA1 pode ser um alvo potencial para o desenvolvimento de novas estratégias relacionadas com os processos gestacionais.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, nas condições propostas, permitem concluir:

1. Alterações no grau de tolerância para a glicose materna influenciam aspectos clínicos e laboratoriais em gestantes diagnosticadas com Diabete Mellitus Gestacional (DMG), apresentando aumento dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) e do peso do recém nascido, quando comparadas às controles não diabéticas (ND).

2. Histologicamente, as vilosidades placentárias do grupo DMG apresentam alterações estruturais, aumentos do depósito de fibrina, nós sinciciais e capilarização.

3. Nos grupos ND e DMG a proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1) é expressa no núcleo e citoplasma do sinciciotrofoblasto, com expressão reduzida nas placentas de gestantes DMG.

4. A presença da DMG, associada à redução da ANXA1 nuclear, aumenta a expressão dos danos oxidativos (8-hidroxi-guanosina) e dupla quebra da fita de DNA (γ H2AX) e, ainda, reduz a expressão das enzimas de reparo por excisão de base (OGG-1 e APE-1).

5. Placentas de gestantes DMG, e com expressão reduzida de ANXA1 nuclear, apresentam aumento da apoptose no sinciciotrofoblasto e nas células estromais.

6. A ausência da ANXA1, em placentas de camundongos *Anxa1* $-/-$, aumenta a expressão dos danos oxidativos (8-hidroxi-guanosina) e dupla quebra da fita de DNA (γ H2AX), reduz a expressão das enzimas de reparo por excisão de base (OGG-1 e APE-1) e, ainda, aumenta a apoptose nas células da zona juncional e labirinto.

Associadas, essas conclusões mostram que a expressão diferencial da ANXA1 no núcleo, em placentas do grupo DMG e *Anxa1* $-/-$, está associada à resposta celular relacionada aos danos de DNA, com possíveis consequências funcionais neste órgão.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, S. Lee et al. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. **Developmental Biology**, v. 250, n. 2, p. 358-373, 2002.
- ADEL, FADI W. et al. Annexin A1 is a Potential Novel Biomarker of Congestion in Acute Heart Failure. **Journal of Cardiac Failure**, v. 26, n. 8, p. 727-732, 2020.
- AGNEZ-LIMA Lucymara F., *et al.* DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutat Res**, v.751, n.1, p. 15-28, jun-set., 2012.
- ALENCAR, Aline Paixao. **Perfil inflamatório em gestações com distúrbios hiperglicêmicos: enfoque na análise das vilosidades coriônicas**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ALVES, Venâncio A. F., *et al.* Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 53, n. 6, p. 715-727, dez., 2008.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. **Diabetes Care**, v. 44, n. Supplement 1, p. S15-S33, 2021.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. Standards of Medical Care in Diabetes-2020. **Diabetes Care**, v. 43, n. Suppl 1, p. S14, 2020.
- AVAGLIANO, Laura; MASSA, Valentina; BULFAMANTE, Gaetano Pietro. *Histology of Human Placenta*, 2016.
- BEDELL, Samantha et al. Effects of Maternal Obesity and Gestational Diabetes Mellitus on the Placenta: Current Knowledge and Targets for Therapeutic Interventions. **Current Vascular Pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 176-192, 2021.
- BENIRSCHKE, Kurt; KAUFMANN, Peter; BAERGEN, Rebecca. Characterization of the developmental stages. **Pathology of the Human Placenta**, p. 174-190, 2006.
- BERGSTRÖM, Ida et al. Annexin A1 in blood mononuclear cells from patients with coronary artery disease: Its association with inflammatory status and glucocorticoid sensitivity. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0174177, 2017.
- BERRA, Carolina M.; MENCK, Carlos F. M.; DI MASCIO, Paolo. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340, jun., 2006.
- BO, Simona et al. Associations between γ -glutamyl transferase, metabolic abnormalities and inflammation in healthy subjects from a population-based cohort: a possible implication for oxidative stress. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 45, p. 7109, 2005.
- BOERSCHMANN Heike, *et al.* Prevalence and predictors of overweight and insulin resistance in offspring of mothers with gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, n. 8, p. 1845-1849, ago., 2010.

- BOKHARI, Bayan; SHARMA, Sudha. Stress marks on the genome: Use or lose?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 364, 2019.
- BOUDHRAA, Zied *et al.* Annexin A1 localization and its relevance to cancer. **Clinical Science**, v. 130, n. 4, p. 205-220, jan., 2016.
- BRINK, Huguette S.; VAN DER LELY, Aart Jan; VAN DER LINDEN, Joke. The potential role of biomarkers in predicting gestational diabetes. **Endocrine Connections**, v. 5, n. 5, p. R26-R34, 2016.
- BURTON, Graham J.; HUNG, Tai-Ho. Hypoxia-reoxygenation; a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. **Fetal and Maternal Medicine Review**, v. 14, n. 2, p. 97, 2003.
- BURTON, Graham J.; JAUNIAUX, Eric. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 213, n.4, p. S6e1-S6.e4, 2015.
- CALDERON, Iracema de Mattos Paranhos *et al.* Diabetes and pregnancy: an update of the problem. **Annual Review of Biomedical Sciences**, p. 1-11, dez., 2007.
- CARDIN, Laila Toniol *et al.* Annexin A1 peptide and endothelial cell-conditioned medium modulate cervical tumorigenesis. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 4, p. 668-681, 2019.
- CHOI, Serah *et al.* Quantitative proteomics reveal ATM kinase-dependent exchange in DNA damage response complexes. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 10, p. 4983-4991, ago., 2012.
- CORRÊA-SILVA, Simone *et al.* Hyperglycemia induces inflammatory mediators in the human chorionic villous. **Cytokine**, v. 111, p. 41-48, nov., 2018.
- COSTA, Maurício B. et al. Mast cell heterogeneity and anti-inflammatory annexin A1 expression in leprosy skin lesions. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 277-284, 2018.
- COSTA, Renata M.A. *et al.* The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083-1099, nov., 2003.
- D'ACQUISTO, Fulvio; PERRETTI, Mauro; FLOWER, Roderick. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 152-169, jan., 2008.
- DAHER, Silvia et al. Inflammatory mediator gene polymorphisms and gestational diabetes: a review of the literature. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 90, n. 1, p. 111-116, 2011.
- DE OLIVEIRA CARDOSO, Marystela Fávero *et al.* Annexin A1 peptide is able to induce an anti-parasitic effect in human placental explants infected by *Toxoplasma gondii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 153-161, out., 2018.

DE PAULA-SILVA, Marina *et al.* Role of the protein annexin A1 on the efficacy of anti-TNF treatment in a murine model of acute colitis. **Biochemical Pharmacology**, v. 115, p. 104-113, set., 2016.

DEBRET, R. *et al.* Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells. **FEBS Letters**, v. 546, n. 2-3, p. 195-202, 2003.

DESOYE, Gernot; HAUGUEL-DE MOUZON, Sylvie. The human placenta in gestational diabetes mellitus: the insulin and cytokine network. **Diabetes Care**, v. 30, n. Supplement 2, p. S120-S126, jul., 2007.

EL SAWY, Naser A. *et al.* Histomorphological study of placenta in gestational diabetes mellitus. **Int. J. Morphol**, v. 36, n. 2, p. 687-692, 2018.

ENDERS, Allen C.; BLANKENSHIP, Thomas N. Comparative placental structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 38, n. 1, p. 3-15, 1999.

FACIO, Fernando N. *et al.* Annexin 1 mimetic peptide protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, n. 1, p. 51-63, jan., 2011.

FLOWER, Roderick J. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 94, n. 4, p. 987-1015, ago., 1988.

FRIEDBERG, Errol C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 436, jan., 2003.

GAUSTER, M. *et al.* The placenta and gestational diabetes mellitus. **Current Diabetes Reports**, v. 12, n. 1, p. 16-23, fev., 2012.

GAVINS, Felicity N. E. *et al.* Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 8, p. 1751-1758, fev., 2007.

GIMENES, Alexandre D. *et al.* Annexin A1-derived peptide Ac 2-26 in a pilocarpine-induced status epilepticus model: anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 32, fev., 2019.

GIMENES, Alexandre D. *et al.* Beneficial effect of annexin A1 in a model of experimental allergic conjunctivitis. **Experimental Eye Research**, v. 134, p. 24-32, 2015.

GUDMUNDSSON, Saemundur; DUBIEL, Mariusz; SLADKEVICIUS, Povilas. Placental morphologic and functional imaging in high-risk pregnancies. In: **Seminars in Perinatology**. WB Saunders, 2009. p. 270-280.

HAN, Gaohua *et al.* Association of nuclear annexin A1 with prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 2, p. 751, jan., 2014.

HAN, Peng-Fei *et al.* Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. **Chinese Journal of Traumatology**, v. 23, n. 2, p. 96-101, 2020.

HEADLAND, Sarah E. et al. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 315, p. 315ra190-315ra190, 2015.

HEBEDA, Cristina B. et al. Annexin A1/Formyl Peptide Receptor Pathway Controls Uterine Receptivity to the Blastocyst. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1188, 2020.

HEBEDA, Cristina B. *et al.* Endogenous annexin A1 (AnxA1) modulates early-phase gestation and offspring sex-ratio skewing. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6591-6603, nov., 2018.

HIRATA, Aiko; CORCORAN, George B.; HIRATA, Fusao. Carcinogenic heavy metals, As³⁺ and Cr⁶⁺, increase affinity of nuclear mono-ubiquitinated annexin A1 for DNA containing 8-oxo-guanosine, and promote translesion DNA synthesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 252, n. 2, p. 159-164, abr., 2011.

HIRATA, Fusao *et al.* Dietary flavonoids bind to mono-ubiquitinated annexin A1 in nuclei, and inhibit chemical induced mutagenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 759, p. 29-36, jan., 2014.

HOCH, Denise et al. Diabesity-associated oxidative and inflammatory stress signalling in the early human placenta. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 66, p. 21-30, 2019.

HUANG, Peng et al. Interaction between ANXA1 and GATA-3 in Immunosuppression of CD4⁺ T Cells. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.

HUBLAROVA, Pavla *et al.* Switching p53-dependent growth arrest to apoptosis via the inhibition of DNA damage-activated kinases. **Cellular & molecular biology letters**, v. 15, n. 3, p. 473, jun., 2010.

HUPPERTZ, Berthold; GHOSH, Debabrata; SENGUPTA, Jayasree. An integrative view on the physiology of human early placental villi. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 114, n. 1, p. 33-48, jan., 2014.

JACKSON, Stephen P.; BARTEK, Jiri. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, 2009.

JAUNIAUX, Eric; POSTON, Lucilla; BURTON, Graham J. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 6, p. 747-755, 2006.

JOHNS, Emma C. et al. Gestational diabetes mellitus: mechanisms, treatment, and complications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 11, p. 743-754, 2018.

KADIVAR, Maryam et al. Histomorphological changes of the placenta and umbilical cord in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. **Placenta**, v. 97, p. 71-78, 2020.

KAUFMANN, Peter; BLACK, Simon; HUPPERTZ, Berthold. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 1-7, jul., 2003.

KNÖFLER, Martin et al. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 18, p. 3479-3496, 2019.

KNOPP, Robert H.; HERRERA, Emilio; FREINKEL, Norbert. Carbohydrate metabolism in pregnancy: VIII. Metabolism of adipose tissue isolated from fed and fasted pregnant rats during late gestation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 49, n. 7, p. 1438-1446, jul., 1970.

KOSICKA, Anna *et al.* Attenuation of plasma annexin A1 in human obesity. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 1, p. 368-378, out., 2013.

LACERDA, Jéssica Zani *et al.* Annexin A12–26 Treatment Improves Skin Heterologous Transplantation by Modulating Inflammation and Angiogenesis Processes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, set., 2018.

LIANG, Zhikun; LI, Xiaoyan. Identification of ANXA1 as a potential prognostic biomarker and correlating with immune infiltrates in colorectal cancer. **Autoimmunity**, p. 1-12, 2021.

LIM, Lina HK; PERVAIZ, Shazib. Annexin 1: the new face of an old molecule. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 968-975, jan. 2007.

LIU, Yuan et al. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13532-13541, 2007.

LORENZON, Aline R. et al. Stromal Cell-Derived Factor (SDF) 2 and the Endoplasmic Reticulum Stress Response of Trophoblast Cells in Gestational Diabetes Mellitus and In vitro Hyperglycaemic Condition. **Current Vascular Pharmacology**, 2020.

MÃE, Valter Hugo. A desumanização. Globo Livros, 2017.

MAH, L. J.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. C. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. **Leukemia**, v. 24, n. 4, p. 679-686, 2010.

MARKKANEN, Enni. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. **DNA repair**, v. 59, p. 82-105, 2017.

MARMORATO, Mariana Prado *et al.* Involvement of the annexin A1-Fpr anti-inflammatory system in the ocular allergy. **European Journal of Pharmacology**, v. 842, p. 298-305, jan., 2019.

MOLÁS, Rafaela *et al.* Ac2–26 peptide and serine protease of Bothrops atrox similarly induces angiogenesis without triggering local and systemic inflammation in a murine model of dorsal skinfold chamber. **Toxicon**, v. 137, p. 7-14, out., 2017.

MOLÁS, Rafaela Batista et al. The involvement of annexin A1 in human placental response to maternal Zika virus infection. **Antiviral Research**, v. 179, p. 104809, 2020.

MOORE, Keith L.; PERSAUD, Trivedi Vidhya Nandan. **Embriologia clínica**. Elsevier Brasil, 2008.

MOORE, Keith; PERSAUD, Trivedi Vidhya Nandan. **Embriología clínica**. Elsevier Brasil, 2016.

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

MORELI, Jusciele B. *et al.* Hyperglycemia differentially affects maternal and fetal DNA integrity and DNA damage response. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 4, p. 466, fev., 2016.

MORELI, Jusciele Brogin *et al.* DNA damage and its cellular response in mother and fetus exposed to hyperglycemic environment. **BioMed Research International**, v. 2014, ago., 2014.

MORELI, Jusciele Brogin *et al.* Influence of maternal hyperglycemia on IL-10 and TNF- α production: the relationship with perinatal outcomes. **Journal of Clinical Immunology**, v. 32, n. 3, p. 604-610, jun., 2012.

MUNN, Terry Z.; MUES, Gabriele I. Human lipocortin similar to ras gene products. **Nature**, v. 322, n. 6077, p. 314, jul., 1986.

MURATA, Mariko. Inflammation and cancer. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2018.

MUSSUNOOR, S.; MURRAY, G. I. The role of annexins in tumour development and progression. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 216, n. 2, p. 131-140, jul., 2008.

MYATT, L.; HIRTH, J.; EVERSON, W. V. Changes in annexin (lipocortin) content in human amnion and chorion at parturition. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 363-373, 1992.

MYATT, Leslie; CUI, Xiaolan. Oxidative stress in the placenta. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, n. 4, p. 369-382, 2004.

NAEYE, Richard L. Infants of diabetic mothers: a quantitative, morphologic study. **Pediatrics**, v. 35, n. 6, p. 980-988, jun., 1965.

NEGRATO, Carlos Antonio *et al.* Mild gestational hyperglycaemia as a risk factor for metabolic syndrome in pregnancy and adverse perinatal outcomes. **Diabetes/metabolism Research and Reviews**, v. 24, n. 4, p. 324-330, fev., 2008.

NG, F.S.P. *et al.* Annexin-1-deficient mice exhibit spontaneous airway hyperresponsiveness and exacerbated allergen-specific antibody responses in a mouse model of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41, n. 12, p. 1793-1803, 2011.

OLIANI, S. M. *et al.* Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, v. 57, n. 10, p. 450-456, oct., 2008.

OLIANI, S. M.; PERRETTI, M. Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response. **Italian Journal of Anatomy and Embryology= Archivio Italiano di Anatomia ed Embriologia**, v. 106, n. 2 Suppl 1, p. 69-77, jan., 2001.

OLIANI, Sonia M.; DAMAZO, Amilcar S.; PERRETTI, Mauro. Annexin 1 localization in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 5, p. 287-292, 2002.

PARISI, Jessica dos Santos; CORRÊA, Mab Pereira; GIL, Cristiane Damas. Lack of endogenous Annexin A1 increases mast cell activation and exacerbates experimental atopic dermatitis. **Cells**, v. 8, n. 1, p. 51, 2019.

PARK, J. J.; LIM, K. H.; BAEK, K. H. Annexin-1 regulated by HAUSP is essential for UV-induced damage response. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 2, p. e1654, fev., 2015.

PATEL, Hetal B. *et al.* The impact of endogenous annexin A1 on glucocorticoid control of inflammatory arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, n. 11, p. 1872-1880, maio, 2012.

PEREIRA, Belmiro Gonçalves *et al.* Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil. **Femina**, p. 786-796, 2019.

PEREIRA, Robyn D. *et al.* Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

PERRETTI, Mauro; FLOWER, Roderick John. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 1, p. 25-29, fev., 2004.

PERRETTI, Mauro; GAVINS, Felicity NE. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. **Physiology**, v. 18, n. 2, p. 60-64, abr., 2003.

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

PRATES, Janesly *et al.* Cisplatin treatment modulates Annexin A1 and inhibitor of differentiation to DNA 1 expression in cervical cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110331, 2020.

PURVIS, Gareth SD *et al.* Annexin A1 attenuates microvascular complications through restoration of Akt signalling in a murine model of type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 61, n. 2, p. 482-495, 2018.

PURVIS, Gareth SD *et al.* Identification of AnnexinA1 as an endogenous regulator of RhoA, and its role in the pathophysiology and experimental therapy of type-2 diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 571, 2019.

RAYNAL, Patrick; POLLARD, Harvey B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1197, n. 1, p. 63-93, abr., 1994.

RED-HORSE, Kristy et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 6, p. 744-754, 2004.

RENTZ, Paula Breitenbach et al. HbA1c test as a tool in the diagnosis of gestational diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135989, 2015.

RESCHER, Ursula; GERKE, Volker. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 13, p. 2631-2639, maio, 2004.

REVISTA FEMINA. São Paulo: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia, v. 47, n. 11, 2019. Mensal. Disponível em: <https://www.febrasgo.org.br/pt/femina/item/898-revista-femina-2019-vol-47-n-11>. Acesso em: 13 maio 2021.

RHEE, Hae Jin *et al.* Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 11, p. 3220-3225, dez., 2000.

RIBEIRO, Afonso Bezerra et al. Expression of annexin-A1 in blood and tissue leukocytes of leprosy patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

RIQUELME, G. Placental chloride channels: a review. **Placenta**, v. 30, n. 8, p. 659- 669, ago., 2009.

ROVIEZZO, Fiorentina et al. The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4, part 1, p. 541-553, 2002.

RUDGE, Marilza VC et al. Histopathological placental lesions in mild gestational hyperglycemic and diabetic women. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2011.

SADOVSKY, Yoel et al. Placental small extracellular vesicles: Current questions and investigative opportunities. **Placenta**, 2020.

SANCHES, José Marcos et al. Role of Annexin A1 in NLRP3 Inflammasome Activation in Murine Neutrophils. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 121, 2021.

SCHOOTS, Mirthe H. et al. Oxidative stress in placental pathology. **Placenta**, v. 69, p. 153-161, 2018.

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

SHEIKH, Madeeha H.; SOLITO, Egle. Annexin A1: uncovering the many talents of an old protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1045, 2018.

SOLITO, Egle *et al.* Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the $\alpha 4\beta 1$ integrin. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 3, p. 1573-1581, ago., 2000.

SONCIN, Francesca; NATALE, David; PARAST, Mana M. Signaling pathways in mouse and human trophoblast differentiation: a comparative review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 7, p. 1291-1302, 2015.

SOULIOTIS, Vassilis L. *et al.* DNA damage response and oxidative stress in systemic autoimmunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 55, 2020.

SPADA, Ana Paula Machado *et al.* Oxidative stress in maternal blood and placenta from mild diabetic rats. **Reproductive Sciences**, v. 21, n. 8, p. 973-977, 2014.

STUQUI, Bruna *et al.* Ac2-26 mimetic peptide of annexin A1 inhibits local and systemic inflammatory processes induced by Bothrops moojeni venom and the Lys- 49 phospholipase A2 in a rat model. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0130803, 2015.

SU, Ning *et al.* Increased expression of annexin A1 is correlated with K-ras mutation in colorectal cancer. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 222, n. 4, p. 243-250, 2010.

SUGIMOTO, Michelle Amantéa *et al.* Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

SULIMAN, Hagir *et al.* Annexin A1 tripeptide mimetic increases sirtuin-3 and augments mitochondrial function to limit ischemic kidney injury. **Frontiers in physiology**, v. 12, 2021.

SUN, M.; LIU, Y.; GIBB, W. Distribution of annexin I and II in term human fetal membranes, decidua and placenta. **Placenta**, v. 17, n. 2-3, p. 181-184, abr., 1996.

SWA, Hannah LF *et al.* Quantitative proteomics profiling of murine mammary gland cells unravels impact of annexin-1 on DNA damage response, cell adhesion, and migration. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 381-393, ago., 2012.

TARICCO, E. *et al.* Effects of gestational diabetes on fetal oxygen and glucose levels in vivo. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 116, n. 13, p. 1729-1735, nov., 2009.

TEDNER, Sandra G.; ÖRTQVIST, Anne K.; ALMQVIST, Catarina. Fetal growth and risk of childhood asthma and allergic disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 10, p. 1430-1447, mar., 2012.

TEIXEIRA, Rodrigo A. P. *et al.* The essential role of annexin A1 mimetic peptide in the skin allograft survival. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. 2, p. E44-E53, 2016.

VAGO, Juliana P. *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 2, p. 249-258, ago., 2012.

VISNES, Torkild *et al.* Targeting BER enzymes in cancer therapy. **DNA Repair**, v. 71, p. 118-126, 2018.

XIA, Qian *et al.* S100A11 protects against neuronal cell apoptosis induced by cerebral ischemia via inhibiting the nuclear translocation of annexin A1. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 6, p. 1-17, 2018.

XU, Jiyang *et al.* The Role and Mechanism of the annexin A1 Peptide Ac2-26 in rats with cardiopulmonary bypass Lung injury. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2021.

YUNG, Hong-wa *et al.* Placental endoplasmic reticulum stress in gestational diabetes: the potential for therapeutic intervention with chemical chaperones and antioxidants. **Diabetologia**, v. 59, n. 10, p. 2240-2250, 2016.

WHITAKER, Amy M. *et al.* Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 22, p. 1493, 2017.

ANEXO A - Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp (359/08)



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenação: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de setembro de 2008

Of. 359/08-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Iracema de Mattos Paranhos Calderon
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª Iracema,

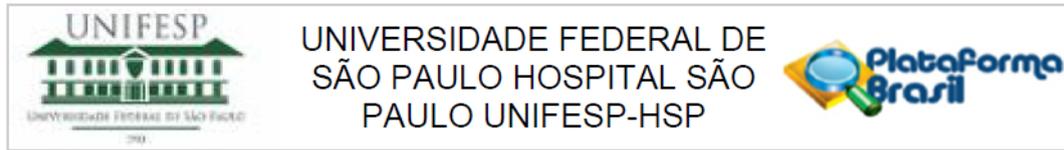
De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "IL-10 e TNF-alfa no sangue materno e nas placentas de gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve - Correlação com controle glicêmico e resultados perinatais", a ser conduzido por Jusciele Brogin Moreli, orientada por Vossa Senhoria, com a participação das Profas Drªs Renée Laufer Amarin e Débora Cristina Damasceno, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01/09/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

ANEXO B – Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, Hospital São Paulo - Unifesp-HSP (CAAE: 48609715.0.0000.5505)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO E POSSÍVEL FUNÇÃO DA ANEXINA A1 NO DESENVOLVIMENTO E NA MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NAS CÉLULAS

Pesquisador: Jusciele Brogin Moreli

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48609715.0.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

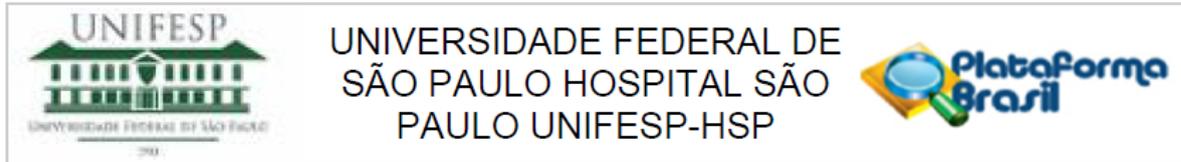
Número do Parecer: 1.267.573

Apresentação do Projeto:

CEP/UNIFESP:1006/2015

A placenta é um órgão complexo formado por estruturas de diferentes origens, morfologia e funções: o cório frondoso (porção fetal) e a decidua basal (porção materna). Esse órgão exclusivo desempenha atividades funcionais da maioria dos órgãos fetais desde o começo do desenvolvimento até o momento do parto. O controle das funções placentárias é complexo, inclui um amplo espectro vias de sinalização, hormônios, fatores de crescimento e proteínas regulatórias e, é essencial para o adequado desenvolvimento do embrião e crescimento do feto. Fatores conhecidos como a hiperglicemia podem comprometer o desenvolvimento da placenta e conseqüentemente do feto. Resultados obtidos durante o mestrado executado pela pós-doutoranda Jusciele Brogin Moreli demonstraram predomínio de TNF- sobre IL-10 no plasma de gestantes com diabete melito gestacional e diabete melito tipo 2 e em placentas de gestantes com diabete melito tipo 2 . Observou-se também que os níveis placentários de IL-10 foram correlacionados de forma positiva com os valores de Apgar de primeiro e quinto minutos, hematócrito e insulina do cordão umbilical. Ainda, níveis de TNF- correlacionaram-se de forma negativa com peso fetal demonstrando o papel dessas citocinas produzidas pela placenta no desenvolvimento fetal. A anexina A1 (ANXA1) foi o primeiro membro caracterizado da superfamília

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.267.573

das anexinas que se ligam aos fosfolípidios de uma forma dependente de cálcio. Inicialmente essa proteína foi denominada lipocortina 1 pelo fato de mimetizar a ação anti-inflamatória dos glicocorticoides afetando muitos componentes da via inflamatória. Resultados recentes obtidos no laboratório da Profa. Sonia Maria Oliani demonstraram o efeito anti-inflamatório do peptídeo mimético Ac2-26 da ANXA1 (porção N-terminal da proteína) em um modelo de tecido ocular de rato com inflamação induzida por endotoxina. Nesse modelo, foi observado redução dos níveis das citocinas IL-1, IL-6 e TNF-, do óxido nítrico e da expressão da COX-2. Por outro lado, observou-se resposta inflamatória exacerbada, caracterizada pela superexpressão da COX-2, em olhos de camundongos ANXA1-/- . Esses achados indicam a importância da ANXA1 na resolução da inflamação ocular. Dentro do contexto gestacional, foi demonstrado que gestantes com pré-eclâmpsia apresentaram aumento dos níveis de auto-anticorpos contra duas proteínas placentárias ANXA1 e ?vitamin D binding protein? no soro. Especialmente a presença de auto-anticorpos contra ANXA1 foi relacionada a inflamação exacerbada típica de gestações acompanhadas por pré-eclâmpsia. Considerando o papel da ANXA1 na resolução da inflamação, a produção de anticorpos contra essa molécula pode ser considerada uma nova hipótese para a origem autoimune dessa patologia gestacional. Considerando as diversas atividades biológicas descritas para ANXA1, especialmente no controle da proliferação, apoptose e inflamação, investigar o papel dessa molécula no desenvolvimento do trofoblasto e na modulação de marcadores relacionados à inflamação dessas células é de extrema relevância para a compreensão do desenvolvimento placentário normal e em doenças gestacionais caracterizadas por exacerbção dos marcadores inflamatórios como observado no diabete melito gestacional

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL Investigar o papel da ANXA1 no desenvolvimento e na modulação da inflamação em células trofoblásticas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS 1) Avaliar a função da ANXA1 na proliferação e apoptose de células trofoblásticas através do tratamento com peptídeo mimético Ac2-26 nas linhagens HTR8 e BeWo. 2) Avaliar a função da ANXA1 na modulação da inflamação em células trofoblásticas através do tratamento com peptídeo mimético Ac2-26 nas linhagens HTR8 e BeWo e posterior avaliação das citocinas inflamatórias IL-8, IL-1?, IL-6 e TNF-? e da .citocina moduladora IL-10, bem como a expressão gênica e proteica dos receptores FPR1 e FPR2 e enzima COX-2. 3) Avaliar a expressão proteica e imunolocalização da ANXA1, FPR1 e FPR2 em placentas de gestantes normais e portadoras de DMG (como modelo de inflamação placentária) 4) Orientação de aluno de iniciação



Continuação do Parecer: 1.267.573

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

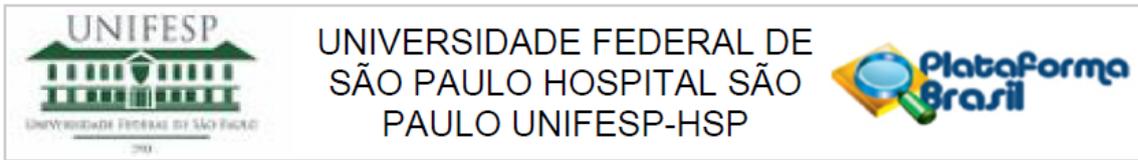
O estudo será realizado com:(a) linhagens de células BeWo e HTR8 obtidas no laboratório da profa. Dra. Estela Bevilacqua (b) amostras de placentas de gestantes (incluídas em parafina e congeladas) acompanhadas pela equipe médica supervisionada pela profa. Dra. Iracema Calderon na Faculdade de Medicina de Botucatu. Enfatizo que essas amostras já foram coletadas e doadas para o presente estudo. Assim, não existe risco adicional às doadoras. Benefícios: A utilização das linhagens de células trofoblásticas possibilitará a realização de ensaios relacionados a proliferação, morte celular e produção de citocinas moduladas pela proteína anexina a1 em experimentos in vitro. Por outro lado, o aproveitamento das amostras de placenta humana já coletadas durante o período de mestrado da beneficiária Jusciéle Brogin Moreli consolidará os resultados obtidos nos experimentos in vitro

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com o objetivo acadêmico de Pós- Doutorado, vinculado ao Departamento/Disciplina e Morfologia e Genética, Campus Vila Clementino. Pós-doutoranda: Dra. Jusciéle Brogin Moreli; Supervisora: Profa. Dra. Sonia Maria Oliani Principais Colaboradores: Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo - ICB/USP. Dra. Aline Rodrigues Lorenzon Ojea, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo - ICB/USP. Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - FCF/USP. Profa. Dra. Iracema de Mattos Paranhos Calderon ? Faculdade de Medicina de Botucatu ? FMB/Unesp

Considerando o objetivo de investigar o papel da Anexina A1 no desenvolvimento e na modulação da inflamação em células trofoblásticas, o presente estudo estudo foi delineado para ser desenvolvido em duas etapas: (1) Estudo in vitro: realizado em linhagens de células trofoblásticas (BeWo e HTR8) tratadas com o peptídeo mimético da Anexina A1 (Ac2-26) para posterior avaliação da proliferação e apoptose celular, produção de citocinas, expressão dos receptores FPR1 e FPR2 e

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.267.573

da enzima COX-2; (2) Estudo transversal - in vivo: realizado com amostras de placenta humana coletadas de gestantes não diabéticas ou portadoras de diabetes gestacional como modelo de inflamação placentária. Essas amostras serão utilizadas para avaliação da expressão da Anexina A1 e seus receptores FPR1 e FPR2.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios apresentados: Folha de Rosto; Projeto Detalhado / Brochura Investigador Outros documentos: Aceite_CEP_coleta_das_amostras.pdf; Declaração de Pesquisadores Autorizacao_Calderon.pdf;

Orçamento financeiro no valor de R\$ R\$ 26.597,00 , com financiamento FAPESP

Recomendações:

nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendencias

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

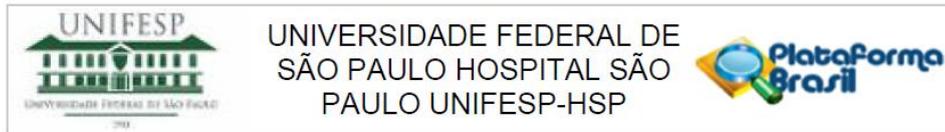
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_575562.pdf	21/08/2015 11:25:55		Aceito
Outros	Aceite_CEP_coleta_das_amostras.pdf	21/08/2015 11:21:43	Jusciéle Brogin Moreli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	21/08/2015 11:21:07	Jusciéle Brogin Moreli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Autorizacao_Calderon.pdf	21/08/2015 11:20:53	Jusciéle Brogin Moreli	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	21/08/2015 11:18:55	Jusciéle Brogin Moreli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.267.573

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 07 de Outubro de 2015

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

ANEXO C – CEUA (521)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 0492021 – CEUA 521

Certificamos que a proposta intitulada "**Anexina A1: mecanismos envolvidos na reprodução e gestação**", registrada com o nº **521**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) Cristina Bichels Hebeda e supervisão do(a) Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), **em reunião de 13 de abril de 2016**.

Finalidade: Pesquisa Científica
Vigência da autorização: 13/04/2016 a 30/04/2017
Espécie/linhagem/raça: Camundongos; Balb/c; K-O ANXA1
Número de animais: 115 M (20/20) F(40/35)
Peso/Idade: 20-25g; 6-8 semanas
Sexo: Macho e Fêmea
Origem: Biotério FCF/IQ - USP

Conforme a legislação vigente, no encerramento do projeto de pesquisa, foi apresentado relatório final que foi aprovado em reunião da CEUA em 17 de agosto de 2018.

São Paulo, 19 de agosto de 2021.

Prof. Dra. Irene Satiko Kikuchi
Coordenadora da CEUA/FCF/USP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 04/10/2021.

A handwritten signature in black ink that reads "Mayk Ricardo dos Santos". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath the name.

Assinatura do autor