

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta Tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/05/2023.



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

Priscila Rezeck Nunes

**Efeito imunomodulador da vitamina D sobre a
ativação de inflamassomas em tecido placentário
de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em
Tocoginecologia.

**Orientadora: Profa. Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Coorientadora: Dra. Mariana Romão Veiga**

**Botucatu
2021**

Priscila Rezeck Nunes

EFEITO IMUNOMODULADOR DA
VITAMINA D SOBRE A ATIVAÇÃO DE
INFLAMASSOMAS EM TECIDO
PLACENTÁRIO DE GESTANTES
PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPSIA

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em
Tocoginecologia.

Orientadora: Prof.^a Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Coorientadora: Dra. Mariana Romão Veiga

Botucatu
2021

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

Nunes, Priscila Rezek.

Efeito imunomodulador da vitamina D sobre a ativação de inflamassomas em tecido placentário de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Priscila Rezek Nunes. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Coorientador: Mariana Romão Veiga

Capes: 40101150

1. Vitamina D. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Inflamassomos.
4. Fatores imunológicos.

Palavras-chave: Explantes placentários; HUVEC;
Inflamassomas; Pré-eclâmpsia; Vitamina D.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia da Reprodução
do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Setor
Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP
– Botucatu.

FINANCIAMENTO



Bolsa CAPES – Doutorado

Período de vigência: março/2017 – outubro/2017



Bolsa FAPESP – Doutorado: Processo nº 2016/23452-2

Período de vigência: novembro/2017 – abril/2021

Auxílio regular à Pesquisa: Processo nº 2016/18155-9

Período de vigência: fevereiro/2017 – julho/2019

Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior – BEPE: Processo nº 2019/00234-8

Período de vigência: maio/2019 – agosto/2019

DEDICATÓRIA



Dedico esse trabalho aos meus pais, Marco e Monica, e agradeço pelo apoio incondicional e por terem me tornado a pessoa que sou hoje. Sou mais forte por saber que vocês sempre estarão ao meu lado. Sei que vocês não mediram esforços para o meu crescimento pessoal e profissional. Sou eternamente grata pela família que somos. Amo vocês!

“Pois onde estiver o seu tesouro, aí também estará o seu coração.”

Mateus 6:19-21

AGRADECIMENTO ESPECIAL



À minha orientadora Maria Terezinha Serrão Peraçoli, a Tizinha, por sempre estar disponível e pronta para debater ideias, trabalhos e receitas. Certamente muito do que sou como cientista devo à senhora. Agradeço pelos nossos caminhos terem se cruzado e por todas as oportunidades de aprendizado. Obrigada por sempre confiar no meu potencial e me incentivar nas aventuras da vida.

“A vida é um instante entre duas eternidades.”

Santa Terezinha do Menino Jesus

AGRADECIMENTOS



Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela proteção, saúde e pelas oportunidades que me concedeu ao longo da vida.

Aos meus pais, Marco e Monica, por sempre se empenharem pela minha educação e bem-estar. Por todos os sacrifícios e obstáculos que superaram até hoje. Eu não seria nada sem vocês.

Ao meu irmão André, por dividir a vida toda comigo, pela sua sabedoria e por todos os memes e risadas compartilhadas. Tenho muito orgulho de ter você como irmão.

Ao meu noivo Diego, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos felizes, por ser meu maior incentivador, mas principalmente por sempre me apoiar nas decisões difíceis e sempre confiar em mim. Um agradecimento especial à toda sua família por sempre me receber tão bem.

À toda família Rezeck Nunes, por sempre estar presente, mesmo à distância, e pelo carinho que sempre recebi de todos vocês.

Ao meu irmãozinho caçula, Rambo, por sempre me alegrar com suas artes e amor incondicional.

Às minhas amigas de infância, menininhas que eu sempre levo no meu coração, e sei que sempre estarão me aplaudindo de pé a cada etapa.

À família Angella, por ser sempre um apoio para mim em Botucatu, e por sempre me incentivarem. Não tenho palavras para agradecer.

À minha coorientadora, amiga e gerente Mariana, por sempre estar disposta a me ajudar em tudo que precisei desde a Iniciação Científica, pelas conversas, conselhos e momentos vividos em todos esses anos.

À minha irmã científica Vanessa, por todos esses anos de cumplicidade e amizade. Contar com você nessa caminhada foi essencial! Obrigada por nunca soltar minha mão e por todo apoio.

A todos e todas que passaram pelo laboratório de Imunologia da Reprodução, pela oportunidade de aprender, ensinar e conviver com cada um, em especial à Mazinha, Amanda e Virgínia.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia por compartilharem protocolos, equipamentos e conhecimentos, em especial à Larissa, por sempre estar disponível para ajudar e compartilhar conversas na hora do almoço.

Aos funcionários do centro cirúrgico do Hospital UNIMED- Botucatu, e ao Doutor Moisés Mendonça Neto, pelo auxílio e receptividade.

Às enfermeiras do centro Obstétrico da Maternidade da Faculdade de Medicina de Botucatu e aos médicos do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pelo apoio logístico e por todo o auxílio técnico, em especial aos Professores José Carlos Peraçoli, Leandro Oliveira e Joelcio Abbade.

Às gestantes que concordaram em participar desse estudo. Sem vocês esse trabalho não existiria.

Ao Professor João Pessoa do Instituto de Biotecnologia da UNESP e todos os seus alunos que contribuíram para o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular dessa tese.

À professora Célia Nogueira, da Unidade experimental da Faculdade de Medicina –UNIPEX, assim como todos os alunos e técnicos dessa unidade, pelo auxílio nas técnicas de Western Blotting e Cultura celular, em especial à Ana Paula, Vick e Igor.

À professora Valéria Sandrim, do Departamento de Farmacologia do IBB, UNESP e suas alunas, pela parceria e por sempre estar disponível para debater ideias. Obrigada por ter me apresentado ao Professor Mattias Carlström e pelo incentivo para o estágio no exterior.

Ao Professor Mattias Carlström, do Karolinska Institutet, Suécia, e todos os seus alunos, por terem me recebido em seu laboratório tão gentilmente. Obrigada pela parceria e por todo o conhecimento adquirido durante a minha estadia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, por possibilitar a realização deste trabalho e aos funcionários pela disponibilidade, atenção, simpatia, gentileza e eficiência em todas as necessidades.

Aos professores e professoras que passaram pela minha caminhada até o fim do doutorado e àqueles que gentilmente colaboraram com o texto da qualificação e da tese, em especial às professoras que aceitaram participar da banca de defesa.

À CAPES e FAPESP (Processo nº 2016/23452-2), pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.



*“Na minha experiência, você quase sempre pode
desfrutar das coisas se decidir, com firmeza, fazê-lo.”*

Anne de Green Gables

Lucy Maud Montgomery

PREFÁCIO



O documento da Tese para obtenção do título de Doutora em Tocoginecologia, intitulado: “Efeito imunomodulador da vitamina D sobre a ativação de inflamassomas em tecido placentário de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia” encontra-se dividido em 6 capítulos.

Inicialmente, a Introdução aborda uma revisão da literatura a respeito da patogênese da pré-eclâmpsia (PE) e suas manifestações clínicas. Também é apresentada a literatura relacionada aos eventos que desencadeiam a inflamação e ativação do inflamassoma, assim como o papel da vitamina D (VD) na PE.

O capítulo um apresenta o manuscrito intitulado “*Vitamin D decreases expression of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes in placental explants from women with preeclampsia*”, que foi submetido à publicação ao periódico *Cytokine*. Os resultados desse manuscrito mostram que o tratamento *in vitro* com VD sugere um papel imunomodulador na inflamação placentária de gestantes com PE e regulação do estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 em explantes placentários.

O capítulo dois contempla o manuscrito intitulado: “*Effects of vitamin D-induced supernatant of placental explants from preeclamptic women on oxidative stress and nitric oxide bioavailability in human umbilical vein endothelial cells*”. Os resultados desse capítulo foram publicados no periódico *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (fator de impacto 2,046). Esse trabalho foi desenvolvido durante o estágio de pesquisa no exterior (BEPE-FAPESP), no Karolinska Institutet, Estocolmo (Suécia), com supervisão do Professor Mattias Carlström.

O capítulo três está apresentado em forma de manuscrito que será enviado para publicação, intitulado: “*Vitamin D modulates inflammasomes in placental explants of preeclamptic women and decreased apoptosis in huvec cultured with*

monosodium urate” e apresenta os resultados de expressão gênica e proteica de componentes do inflamassoma e citocinas inflamatórias em explantes placentários e também apoptose em células endoteliais (HUVEC) frente ao estímulo com urato monossódico (MSU). Esses dados mostram a ação da VD na modulação da ativação dos inflamassomas NLRP1/NLRP3 e na diminuição da produção de citocinas inflamatórias e apoptose.

No capítulo quatro, intitulado “*Vitamin D maintains viability and decreases apoptosis in HUVEC and modulates inflammation in placental explants from preeclamptic pregnant women cultured with TNF- α* ”, os resultados demonstraram que o tratamento *in vitro* com VD tem um papel imunomodulador na produção de citocinas em explantes placentários e apoptose em células endoteliais cultivadas com TNF- α . Esse capítulo também está apresentado em forma de manuscrito que será enviado para publicação.

Por fim, no capítulo cinco, encontram-se apresentadas as conclusões gerais do trabalho.

O capítulo seis contém os anexos referentes aos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e ao Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa.

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	15
Resumo	17
Introdução	18
Capítulo 1	31
Capítulo 2	53
Capítulo 3	77
Capítulo 4	106
Capítulo 5	128
Capítulo 6	130

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS



ANOVA: análise de variância
cDNA: DNA complementar
cm: centímetros
DAMPs: padrões moleculares associados ao dano
DCFH: *dichlorodihydrofluorescein diacetate*
DMSO: *dimethyl sulfoxide*
DNA: ácido desoxirribonucleico
DR5: *death receptor 5*
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática
EOPE: *early-onset preeclampsia*
EROs: espécies reativas de oxigênio
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato- desidrogenase
h: horas
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HCl: ácido clorídrico
Hg: mercúrio
HMGB1: *high-mobility group box one*
HPLC: *high-performance liquid chromatography*
HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
IL: interleucina
IFN- γ : interferon gama
L: litro
LDH: lactato desidrogenase
LOPE: *late-onset preeclampsia*
MDA: malondialdeído
mg: miligramas
min: minuto
mL: mililitros
mM: milimolar
mm: milímetros
MSU: urato monossódico
NaCl: cloreto de sódio
ng: nanograma

NLRP: receptor *nod-like*
NT: normotensa
NO: óxido nítrico
NO₂⁻: nitrato
NO₃⁻: nitrito
°C: graus Celsius
O₂⁻: ânion superóxido
p: nível de significância
PAMPs: padrões moleculares associados à patógenos
PBS: solução salina tamponada (*phosphate buffered saline*)
PE: pré-eclâmpsia
PI: *propidium iodide*
PRR: receptores de reconhecimento padrão
RNA: ácido ribonucleico
RNA_m: RNA mensageiro
RPM: rotação por minuto
RPMI: meio sintético complexo (*Roswell Park Memorial Institute*)
ROS: *reactive oxygen species*
qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
s: segundo
SD: desvio padrão (*standard deviation*)
SBF: soro bovino fetal
SNP: *single nucleotide polymorphisms*
TBARS: *thiobarbituric acid reactive substances*
Tbhp: *Tert-butyl hydroperoxide*
TCA: *trichloroacetic acid*
TMP: *tetramethoxypropane*
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
TRAIL: *tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*
VD: vitamina D
VDR: receptor de vitamina D (*vitamin D receptor*)
µg: micrograma
µL: microlitro
µM: micromolar
25(OH)D: 25-hidroxivitamina D
1,25(OH)D: 1,25- dihidroxivitamina D

Resumo

Gestações complicadas por pré-eclâmpsia (PE) estão associadas com isquemia/hipóxia placentária, estresse oxidativo e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. A ativação do inflamassoma NLRP3, representada por maior expressão gênica e proteica dos componentes desse complexo relacionado à inflamação, como caspase-1, interleucina-1 beta (IL-1 β) e *high-mobility group box-1* (HMGB1), foi descrita em placenta de gestantes pré-eclâmpicas, quando comparadas às gestantes normotensas (NT). A hiperativação do inflamassoma NLRP3 nos tecidos placentários pode estar envolvida no estado inflamatório sistêmico exacerbado da PE. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação imunomoduladora da vitamina D (VD) sobre os inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em explantes placentários de gestantes portadoras de PE e de NT e *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC), bem como a apoptose nessas células. Foram avaliadas 30 gestantes assim distribuídas: 10 portadoras de PE precoce (idade gestacional < 34 semanas), 10 portadoras de PE tardia (idade gestacional $\geq$ 34 semanas) e 10 NT. Após a realização do parto cesáreo, fragmentos de aproximadamente 10 mg foram imediatamente retirados da região central da placenta, de modo que constituíssem amostras do citotrofoblasto viloso e da região do sinciciotrofoblasto em contato com a face materna. Os explantes e as HUVEC foram cultivados na presença ou ausência de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), urato monossódico (MSU), fator de necrose tumoral (TNF- α) e tratados com VD. Após 4 e 18 horas de cultivo os explantes e as células endoteliais foram submetidos à avaliação da expressão gênica e proteica de NLRP1, NLRP3, caspase-1, IL-1 β , IL-18, TNF- α , HMGB1, *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) e *vitamin D receptor* (VDR) por qPCR, ELISA e Western Blot. A apoptose nas células também foi avaliada por citometria de fluxo. De maneira geral, os resultados mostraram que o tratamento *in vitro* com VD é capaz de modular a inflamação placentária em gestantes com PE e diminuir o estresse oxidativo, induzido pelos tratamentos com MSU e H₂O₂ em explantes placentários e HUVEC, bem como aumentar a viabilidade e diminuir a apoptose nessas células estimuladas com TNF- α . A utilização de agentes com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, como a VD é um campo de pesquisa que deve ser mais explorado em futuras investigações para entender o mecanismo pelo qual a VD atua na imunomodulação da resposta inflamatória na PE.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia, explantes placentários, HUVEC, vitamina D, citocinas, inflamassomas, apoptose.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

INTRODUÇÃO



A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação humana, considerada a principal causa de morbidade e mortalidade entre 2 a 8% das gestações no mundo todo (ACOG, 2020) e uma das principais causas de morte materna no Brasil, responsável por 37% das causas de morte obstétricas diretas (Laurenti et al., 2009). Os parâmetros clínicos que caracterizam essa patologia são: hipertensão arterial e proteinúria a partir da vigésima semana de gestação ou nos primeiros dias após o parto. Entretanto, outras disfunções maternas também podem estar relacionadas com a PE, como insuficiência renal, envolvimento hepático, complicações neurológicas ou hematológicas, disfunção útero-placentária ou restrição de crescimento fetal (Tranquilli et al., 2014; Mol et al., 2016).

A gestação normal é caracterizada por resposta inflamatória sistêmica leve, representando uma resposta de adaptação do organismo materno para permitir o crescimento e desenvolvimento fetal (van Rijn et al., 2008). Essa adaptação é resultado da ativação da imunidade inata, levando à reação inflamatória leve, que não indica doença, mas atua como mecanismo protetor do organismo materno contra infecções, visto que a resposta imune adaptativa se encontra ligeiramente diminuída (Wegmann et al., 1993).

Durante o segundo trimestre de gravidez, ocorre o processo de remodelação das artérias espiraladas maternas que, com a invasão do trofoblasto, se diferenciam fenotipicamente em células endoteliais (Collins et al., 2012). A vasculogênese garante o suprimento sangüíneo adequado para a placenta e o suporte nutricional e respiratório do feto. Entretanto, observa-se que em placentas de gestantes com PE a invasão trofoblástica é inadequada, acontecendo em apenas 30-50% das artérias (von Dadelszen et al., 2003). Essa falência na remodelação vascular pode levar à má perfusão e isquemia placentárias (George & Granger, 2011). A isquemia acontece devido ao fato de que as artérias não são suficientemente remodeladas, ocorrendo uma perfusão desordenada do fluxo sangüíneo para o espaço intervilloso. Somado a um suprimento inadequado de nutrientes e oxigênio, ocorre a redução da área de superfície disponível para troca entre mãe e feto, o que pode contribuir para os desfechos desfavoráveis relacionados à gestação (Turco & Moffet, 2019).

A fisiopatologia da PE ainda não está totalmente esclarecida, mas

atualmente sabe-se que a isquemia placentária tem fundamental importância nesse processo, já que a liberação de produtos resultantes de má perfusão na circulação materna pode levar à disfunção endotelial sistêmica (Burton et al., 2019).

Além da isquemia placentária, o estresse oxidativo também é uma característica marcante em gestações complicadas pela PE (Burton & Jauniaux, 2004; Myatt & Cui, 2004) e pode ser resultante de lesão causada por hipóxia e reperfusão (Burton & Hung, 2003) e/ou deficiência das defesas antioxidantes (Perkins, 2006). Peraçoli et al. (2011) relataram a ativação endógena de monócitos de gestantes portadoras de PE, associada à produção elevada de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) por essas células, demonstrando que a PE é caracterizada por estresse oxidativo.

Os produtos resultantes da disfunção endotelial e estresse oxidativo podem agir como mediadores inflamatórios, ativando o sistema imune inato, o primeiro mecanismo pelo qual o organismo responde imediatamente a infecções e injúrias. Receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors* - PRRs) reconhecem moléculas liberadas por patógenos ou células danificadas. Esses sinais moleculares são chamados de padrões moleculares associados ao dano (*damage-associated molecular pattern* - DAMPs) ou à patógenos (*pathogen associated molecular pattern* - PAMPs) (Gong et al., 2020).

As DAMPs podem estar presentes no plasma das gestantes e são consideradas importantes indutoras da resposta inflamatória. Alguns exemplos de DAMPs são moléculas como reativos intermediários do oxigênio, proteínas de choque térmico, proteínas liberadas de células mortas como o *high-mobility group Box-1* – HMGB1, e ácido úrico (Asea et al., 2002; Park et al., 2004).

Receptores de reconhecimento padrão, importantes na resposta inflamatória, fazem parte da família *Nod-like* ou NLR (proteína com domínio de oligomerização nucleotídica), são proteínas citosólicas capazes de reconhecer PAMPs e DAMPs citoplasmáticos e recrutar outras proteínas, formando complexos de sinalização que promovem a inflamação, denominados inflamassomas (Lamkanfi et al., 2007).

Entre todos os inflamassomas descritos até o momento, o *NLR family pyrin domain containing 3* (NLRP3) é o melhor caracterizado (Kelley et al., 2019). A ativação de NLRP3 pode ocorrer devido a vários estímulos, entre eles a produção

de espécies reativas de oxigênio (EROs) (He et al., 2016), que são os primeiros reativos intermediários produzidos durante esse processo, estando envolvidos na formação e ativação de NLRP3 e sendo responsáveis pela liberação de agentes inflamatórios durante a resposta imune (Abais et al., 2015).

Ainda não se sabe detalhadamente como as EROs atuam na ativação do inflamassoma. Estudos recentes indicam que elas são induzidas por ativadores de NLRP3 e são essenciais como mensageiros secundários para a sinalização de ativação de NLRP3 (Martinon, 2010). O_2^- e H_2O_2 podem agir como segundo sinal para ativar inflamassomas em podócitos, células importantes em lesões renais. Abais et al. (2014) mostraram que a decomposição da H_2O_2 pela catalase previne a agregação de inflamassomas NLRP3 em podócitos de camundongos, o que pode diminuir a injúria glomerular. Bauernfeind et al. (2009) investigaram o papel das substâncias capazes de inibir a produção de EROs, e encontraram evidências de que essas substâncias não necessariamente ativam o inflamassoma, mas fazem parte de sua indução. Não existem na literatura estudos que relacionam as EROs à ativação do inflamassoma na PE e melhores investigações são necessárias para adquirir mais conhecimento sobre essa via e desenvolver possíveis alvos terapêuticos.

Nunes et al. (2018) demonstraram que H_2O_2 leva à ativação de NLRP3 em explantes placentários de gestantes normotensas (NT), como consequência da indução de estresse celular, com aumento da expressão de caspase-1, interleucina 1 β (IL-1 β) e TNF- α . Esse processo inflamatório também está associado com baixa produção de interleucina 10 (IL-10), uma citocina essencial na gestação normal, auxiliando na placentação adequada, controlando a inflamação excessiva e regulando a expressão gênica de IL-1 β e TNF- α (Moore et al., 2001; Cubro et al., 2018).

A ativação do inflamassoma gera formas ativas da interleucina IL-1 β e IL-18 (Abbas et al., 2012). A IL-1 β é uma citocina inflamatória importante, liberada durante a resposta inflamatória endotelial e, de maneira interessante, a ativação de NLRP3 produz grandes quantidades de IL-1 β (Godo & Shimokawa, 2017). Além disso, esse processo contribui para liberação de HMGB1 e a morte celular induzida por patógenos bacterianos (Schroder & Tschopp, 2010; Gross et al., 2011). A ligação de DAMPs, como o ácido úrico, na forma de urato monossódico (MSU),

pode ativar o inflamassoma NLRP3 (Lamkanfi et al., 2007). Em trabalho recente, foi demonstrado que monócitos de gestantes com PE estimulados com MSU tem a expressão gênica do inflamassoma NLRP3 aumentada (Matias et al., 2015).

NLRP1 e NLRP3 também são expressos em células imunes, células endoteliais e em outros tipos celulares como células placentárias (Abrahams, 2011; Pontillo et al., 2013). Weel et al. (2017) avaliaram a ocorrência do inflamassoma NLRP3 em placenta de gestantes portadoras de PE, com o objetivo de desvendar o papel do inflamassoma na interface materno-fetal. Foram detectados níveis elevados de RNA mensageiro (RNAm) de NLRP3, caspase-1, IL-1 β , TNF- α e HMGB1 em tecido placentário, bem como aumento significativo dos níveis de caspase-1, IL-1 β , TNF- α e HMGB1 em homogenato de placenta de gestantes portadoras de PE, quando comparadas às NT. Esses resultados sugerem que a hiperativação do inflamassoma NLRP3 nos tecidos placentários pode estar envolvida no estado inflamatório sistêmico exacerbado da PE (Weel et al., 2017).

A inflamação persistente no endotélio estimula a secreção de vários mediadores inflamatórios, e por isso é um processo importante em algumas doenças inflamatórias, pois podem ativar diversos padrões de sinalização. A IL-1 β é liberada durante a resposta inflamatória endotelial e a ativação de NLRP3 produz grandes quantidades de IL-1 β (Godo & Shimokawa, 2017). Células endoteliais são alvo para IL-1 β e também a produzem durante a inflamação (Wang et al., 2011). Além disso, o excesso de produção de EROs pode aumentar o catabolismo do óxido nítrico (NO), levando à diminuição da sua disponibilidade. Esse desbalanço entre EROs-NO leva à expressão de genes relacionados a inflamação, o que por sua vez pode prejudicar a função endotelial (Shihata et al., 2016). Observando a importância das células endoteliais na PE, a utilização de HUVECS se torna uma boa alternativa de modelo experimental *in vitro* (Caldeira-Dias et al., 2018; Gonçalves-Rizzi et al., 2018; Caldeira-Dias et al. 2019).

A apoptose é um mecanismo celular intrínseco que leva a auto-destruição celular. É um fenômeno fisiológico necessário na embriogênese, estresse celular e remoção de células lesadas, bem como para controlar a proliferação celular anormal em condições patológicas (Hockenbery et al., 1994). Esse processo celular é induzido por estímulos específicos e ocorre em células que participam de vias

relevantes para o organismo (Thompson, 1995). A apoptose é essencial para a homeostase dos tecidos humanos, incluindo a placenta. O aumento da apoptose do trofoblasto durante a PE pode contribuir para supressão da angiogênese e o crescimento placentário levando ao desenvolvimento da doença (Barakonyi et al., 2014).

Recentemente, alguns autores têm discutido a apoptose em trofoblastos humanos e sua possível implicação no desenvolvimento normal, remodelação, e envelhecimento da placenta. Esse processo é importante para a placentação adequada, mas pode estar envolvido na fisiopatologia de doenças relacionadas à gestação. A apoptose no trofoblasto aumenta em placentas normais de acordo com a progressão da gestação, e uma elevada incidência de apoptose é observada em gestações com PE e restrição de crescimento fetal (Shawn et al., 2005; Sinha et al., 2016).

O TNF- α foi a primeira citocina identificada como sendo capaz de induzir a apoptose em trofoblastos humanos. Em combinação com o interferon gama (IFN- γ), o TNF- α estimulou a apoptose em sincício e citotrofoblastos (Garcia-Lloret et al., 1996; Pijnenborg et al., 2000). O TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*) é o terceiro receptor de morte no sistema de regulação da apoptose no sistema imune (Barakonyi et al., 2014). Durante a PE, o aumento na expressão de TRAIL por células trofoblásticas é provavelmente um mecanismo contra sinais apoptóticos de linfócitos e células *natural killer* maternas (Sokolov et al., 2009). Chaemsaitong et al. (2014) mostraram que os níveis plasmáticos de TRAIL solúvel são menores em mulheres com PE em comparação com as normotensas. Zauli et al. (2012) sugeriram um papel preditivo de TRAIL solúvel (sTRAIL) como um risco para desenvolvimento de distúrbios hipertensivos na gestação, como a PE.

Um dos ligantes de TRAIL, *death receptor 5* (DR5), é detectado em células trofoblásticas. O estímulo com citocinas como o TNF- α pode levar ao redirecionamento de DR5 para a superfície celular e consequentemente aumentar a suscetibilidade das células trofoblásticas ao TRAIL. É sugerido que o estímulo excessivo com TNF- α pode causar dano celular, como ocorre na PE (Barakonyi et al., 2014).

A vitamina D exerce inúmeros efeitos no organismo. Em relação ao sistema imune inato e adaptativo, ela é capaz de estabelecer um estado imune mais tolerogênico, principalmente por apresentar atividades reguladoras sobre a resposta inflamatória. Durante a gestação normal, a vitamina D é produzida por células trofoblásticas placentárias e da decídua humana, sendo responsável por exercer um papel anti-inflamatório em vários órgãos, incluindo a placenta (Xu et al., 2014). Esse hormônio possui atividades estruturais e fisiológicas semelhantes à progesterona nos estágios iniciais da gestação, desempenhando um papel importante na implantação, placentação e manutenção da gestação saudável (Monastra et al., 2018). Durante a gestação humana, a conversão de 25(OH)D em 1,25(OH)₂D está aumentada na placenta, demonstrando que ela e a decídua são importantes no metabolismo da vitamina D (Murthi et al., 2016).

Estudos recentes relatam deficiência de vitamina D em gestantes portadoras de PE (Robinson et al., 2013; Xu et al., 2014; Mohaghegh et al., 2015) além da ocorrência de parto prematuro (Yuan et al., 2019; Pashapour et al., 2019), enquanto outros mostram associação entre essa deficiência e o risco de desenvolvimento de PE (Aghajafari et al., 2013; Bodnar et al., 2014; Akbari et al., 2018). Esses resultados da literatura sugerem que a suplementação de vitamina D pode proteger o organismo materno por sua influência sobre a função vascular, modulação da resposta imune, homeostase e capacidade de manutenção do trofoblasto (Hyppönen et al., 2013; Hutabarat et al., 2018). Apesar dessas evidências, mais estudos clínicos, utilizando a VD para tratamento de síndromes da gestação, devem ser conduzidos baseados no histórico clínico e pessoal das pacientes, bem como questões étnicas e raciais (Cyprian et al., 2019; Dvornik et al., 2018).

Em conclusão, os estudos mostram que o estresse oxidativo, a ativação do inflamassoma associada à produção aumentada de citocinas inflamatórias, assim como apoptose aumentada são descritos na placenta de mulheres com gestações complicadas por PE. Portanto, o tratamento *in vitro* de explantes placentários de gestantes pré-eclâmpticas e HUVECs com a VD poderia contribuir para um melhor conhecimento dos processos envolvidos na inflamação sistêmica da PE e das células endoteliais e sugerir o emprego da VD como tratamento adjuvante dessa importante síndrome da gestação.

Referências



Abais JM, Xia M, Li G, Gehr TW, Boini KM, Li PL. Contribution of endogenously produced reactive oxygen species to the activation of podocyte NLRP3 inflammasomes in hyperhomocysteinemia. *Free Radic Biol Med*. 2014 ; 67:211-220.

Abais JM, Xia M, Zhang Y, Boini KM, Li PL. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxid Redox Signal*. 2015;22:1111–1129.

Abbas AK, Lichtman A, Pillai S. Imunidade inata. In: *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 7ª.ed, 2012; 55-68.

Abrahams VM. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *J Reprod Immunol*. 2011; 88(2):112-117.

Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*. 2013; 346:f1169.

Akbari S, Khodadadi B, Ahmadi SAY, Abbaszadeh S, Shahsavari F. Association of vitamin D level and vitamin D deficiency with risk of preeclampsia: a systematic review and updated meta-analysis. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2018; 57:241-247.

American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin number 222. Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*. 2020; 135(6) 237-260.

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002; 277(17):15028-15034.

Barakonyi A, Miko E, Szereday L, Polgar PD, Nemeth T, Szekeres-Bartho J, Engels GL. Cell death mechanisms and potentially cytotoxic natural immune cells in human pregnancies complicated by preeclampsia. *Reprod Sci*. 2014 ; 21(2):155-66.

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, FernandesAlnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge:

NF-kappa B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009; 183(2):787-791.

Bodnar LM, Simhan HN, Catov JM, Roberts JM, Platt RW, Diesel JC, Klebanoff MA. Maternal vitamin D status and the risk of mild and severe preeclampsia. *Epidemiology.* 2014; 25(2):207-214.

Burton GJ, Hung TH. Hypoxia-reoxygenation: a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. *Fetal Mat Med Rev* 2003; 14:97-117.

Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2004; 11(6):342-352.

Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, Moffett A. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *BMJ.* 2019; 366; l2381.

Caldeira-Dias M, Luizon MR, Deffune E, Tanus-Santos JE, Freire PP, Carvalho RF, et al. Preeclamptic plasma stimulates the expression of miRNAs, leading to a decrease in endothelin-1 production in endothelial cells. *Pregnancy Hypertens.* 2018; 12:75-81.

Caldeira-Dias M, Montenegro MF, Bettiol H, Barbieri MA, Cardoso VC, et al. Resveratrol improves endothelial cell markers impaired by plasma incubation from women who subsequently develop preeclampsia. *Hypertens Res.* 2019; 42(8):1166-1174.

Chaemsaihong P, Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, Stampalija T, Than NG, Dong Z, Miranda J, Yeo L, Hassan SS. Maternal plasma soluble TRAIL is decreased in preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014; 217-227.

Collins SL, Birks JS, Stevenson GN, Papageorgiou AT, Noble JA, Impey L. Measurement of spiral artery jets: general principles and differences observed in small-for-gestational-age pregnancies. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2012; 40:171-178.

Cubro H, Kashyap S, Nath MC, Ackerman AW, Garovic VD. The role of interleukin-10 in the pathophysiology of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2018; 20:36.

Cyprian F, Lefkou E, Varoudi K, Girardi G. Immunomodulatory effects of vitamin D in pregnancy and beyond. *Front Immunol.* 2019; 10:2739.

Dovnik A, Mujezinović F. The association of vitamin D levels with common pregnancy complications. *Nutrients.* 2018; 5:10.

Garcia-Lloret MI, Yui J, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. Epidermal growth factor inhibits cytokine-induced apoptosis of primary human trophoblasts. *J Cell Physiol.* 1996; 167(2):324-332.

George EM, Granger JP. Mechanisms and potential therapies for preeclampsia.

Curr Hypertens Rep. 2011; 13:269-275.

Godo S, Shimokawa H. Endothelial functions. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2017; 37: e108–e114.

Gonçalves-Rizzi VH, Possomato-Vieira JS, Nascimento RA, Caldeira-Dias M, Dias-Junior CA. Maternal hypertension and feto-placental growth restriction is reversed by sildenafil: Evidence of independent effects of circulating nitric oxide levels. *Eur J Pharmacol.* 2018; 5;822:119-127.

Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20:95–112.

Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev.* 2011; 243(1):136-151.

He Y, Hara H, Nunez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci.* 2016; 41:1012–1021.

Hutabarat M, Wibowo N, Obermayer-Pietsch B, Huppertz B. Impact of vitamin D and vitamin D receptor on the trophoblast survival capacity in preeclampsia. *PLoS One.* 2018; 8: e0206725.

Hockenbery DM. Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 18(suppl):51–55.

Hyppönen E, Cavadino A, Williams D, Fraser A, Vereczeky A, Fraser WD, Bánhidý F, Lawlor D, Czeizel AE. Vitamin D and pre-eclampsia: original data, systematic review and meta-analysis. *Ann Nutr Metab.* 2013; 63(4):331-340

Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:3328.

Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, Núñez G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(2):220-225.

Laurenti R, Jorge MHPM, Gotlieb SLD. Deaths due to infectious diseases in women: occurrences in pregnancy and puerperium. *Rev Assoc Med Bras.* 2009; 55(1):64-69.

Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol.* 2010; 40(3):616-619.

Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, Araújo JP Jr, Peraçoli JC, de Oliveira L, Peraçoli MT. Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in pregnant women with preeclampsia. *PLoSOne.* 2015; 10(6):e0129095.

Mohaghegh Z, Abedi P, Dilgouni T, Namvar F, Ruzafza S. The relation of

preeclampsia and serum level of 25-hydroxyvitamin d in mothers and their neonates: a case control study in iran. *Horm Metab Res.* 2015; 47(4):284-248.

Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2016; pii:S0140-6736:70-77.

Monastra G, De Grazia S, De Luca L, Vittorio S, Unfer V. Vitamin D: a steroid hormone with progesterone-like activity. *Eur. Rev. Med Pharmacol Sci.* 2018; 22:2502-2512.

Moore KW, Malefyt RW, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:683-765.

Murthi P, Yong HE, Ngyuen TP, Ellery S, Singh H, Rahman R, Dickinson H, Walker DW, Davies-Tuck M, Wallace EM, Ebeling PR. Role of the placental vitamin D receptor in modulating feto-placental growth in fetal growth restriction and preeclampsia-affected pregnancies. *Front Physiol.* 2016; 18(7):43.

Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122(4): 369-382.

Nunes PR, Peraçoli MTS, Romão-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Fernandes CJC, et al. Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress induces inflammasome activation in term human placental explants. *Pregnancy Hypertens.* 2018; 14:29-36.

Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004; 279(9):7370-7377.

Pashapour S, Golmohammadlou S, Behrooz-Lak T, Ghasemnejad-Berenji H, Sadeghpour S, Ghasemnejad-Berenji M. Relationship between low maternal vitamin D status and the risk of severe preeclampsia: a case control study. *Pregnancy Hypertens.* 2019; 15:161-165.

Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, Medeiros Borges VT, Araújo Costa RA, Witkin SS, Peraçoli JC. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66(6):460-467.

Perkins AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006; 46(2):77-83.

Pijnenborg R, Luyten C, Vercruysse L, Keith JC Jr, Van Assche FA. Cytotoxic effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha and interferon-gamma on cultured human trophoblast are modulated by fibronectin. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6(7):635-641.

Pontillo A, Girardelli M, Agostinis C, Masat E, Bulla R, Crovella S. Bacterial LPS

differently modulates inflammasome gene expression and IL-1 β secretion in trophoblast cells, decidual stromal cells, and decidual endothelial cells. *Reprod Sci.* 2013; 20(5):563-566.

Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, Baatz JE, Johnson DD. Association of maternal vitamin D and placenta growth factor with the diagnosis of early onset severe preeclampsia. *Am J Perinatol.* 2013; 30(3):167-172.

Sinha, R, Pandey L.K, Pandey S., Tripathi K. Placental Apoptosis and its correlation with severity of disease in preeclampsia and eclampsia. *Inter Journal of Scientific Reseach.* 2016; 4:10.

Shawn L. Straszewski-Chavez, Vikki M. Abrahams, Gil Mor, The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine Reviews.* 2005; 26:877–897.

Shihata WA, Michell DL, Andrews KL, Chin-Dusting JP. Caveolae: a role in endothelial inflammation and mechanotransduction? *Front Physiol.* 2016; 7:628.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010; 19;140(6):821-832.

Sokolov DI, Kolobov AV, Lesnichija MV, Kostiouchek IN, Stepanova OI, Kvetnoy IM, Selkov SA. Regulatory mechanisms for apoptosis in placental tissue during normal pregnancy and gestosis-complicated pregnancy. *Bull Exp Biol Med.* 2009; 148(5):766-770.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 10; 267(5203):1456-62.

Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 2014; 4:97-104.

Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development.* 2019; 27; 146(22).

van Rijn BB, Franx A, Steegers EA, de Groot CJ, Bertina RM, Pasterkamp G, Voorbij HA, Bruinse HW, Roest M. Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS ONE.* 2008; 3(4):e1865.

von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of Preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2003; 22(2):143-148.

Wang, JG, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, et al. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL- 1beta-dependent manner. *Blood.* 2011; 118:2366–2374.

Weel IC, Romão-Veiga M, Matias ML, Fioratti EG, Peraçoli JC, Borges VT, Araujo JP Jr, Peraçoli MT. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2017; 123:40-47.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14(7): 353-356.

Xu L, Lee M, Jeyabalan A, Roberts JM. The relationship of hypovitaminosis D and IL-6 in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2014; 210(2):149.e1-7.

Yuan Y, Tai W, Xu P, Fu Z, Wang X, Longet W, et al. Association of maternal serum 25-hydroxyvitamin D concentrations with risk of preeclampsia: a nested case-control study and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019; 17: 1-10.

Zauli G, Monasta L, Vecchi Brumatti L, Ronfani L, D'ottavio G, Secchiero P. The early determination of circulating TRAIL levels does not predict the development of preeclampsia. *Placenta*. 2012;33(2):135-136.