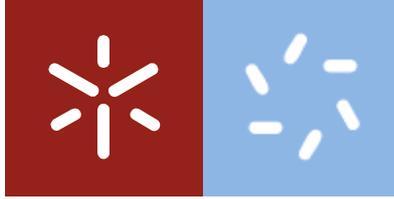


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Cláudia Raquel Santos Silva

**O efeito da insulina na placentação:
estudos *in vitro* com células HTR8/SVneo**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Cláudia Raquel Santos Silva

**O efeito da insulina na placentação:
estudos *in vitro* com células HTR8/SVneo**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioquímica Aplicada

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria de Fátima Moreira Martel
e do
Professor Doutor José Alberto Ribeiro Martins

Declaração

Nome: Cláudia Raquel Santos Silva

Endereço electrónico: rakelclaudia@hotmail.com

Telefone: +351 915576144

Número do Cartão de Cidadão: 14007839

Título Dissertação de Mestrado: O efeito da insulina na placentação: estudos *in vitro* com células HTR8/SVneo

Orientadora: Professora Doutora Maria de Fátima Moreira Martel

Co-orientador: Professor Doutor José Alberto Ribeiro Martins

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado em Bioquímica Aplicada, especialização em Biomedicina

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A realização desta Tese só foi possível graças ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas, às quais gostaria de dedicar algumas palavras de agradecimento pela oportunidade de aprendizagem que me foi proporcionada.

À Professora Doutora Fátima Martel, em primeiro lugar pela sua incansável orientação científica e pelo apoio constante no desenvolvimento deste trabalho. Por todos os ensinamentos, discussões de ideias e correções, fundamentais para a realização desta tese, e pela sua total disponibilidade para me ajudar a melhorar.

À Doutora Ana Branco por todos os ensinamentos, teóricos e práticos, sem os quais esta tese não teria sido possível. Pelo apoio e ajuda no decorrer do trabalho e por partilhar comigo todas as dificuldades.

Ao Professor Doutor João Araújo por todo apoio e disponibilidade no decorrer deste trabalho.

À Professora Doutora Elisa Keating, por todo o apoio e disponibilidade prestada ao longo de todo o desenvolvimento deste projeto.

À Mestre Ilda Rodrigues, pelo carinho e disponibilidade prestada todas as vezes que precisei.

A todos os colegas de laboratório pela forma acolhedora como me receberam desde do primeiro dia, pela sua amizade, e por terem contribuído para esta experiência tão enriquecedora de aprendizagem. De uma forma muito especial à Catarina Nunes e Rita Rocha pela partilha de angústias e alegrias ao longo destes últimos tempos. Porque é muito importante ter alguém com quem traçar um bom plano! Porque há pessoas que entram na nossa vida e passam a fazer parte dela como se sempre lá tivessem estado.

À Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto por me receber neste estágio tão enriquecedor e tornar possível a realização deste trabalho.

Ao professor Doutor José Alberto Martins, pela sua total disponibilidade e ajuda na co-orientação deste projeto.

A todas(os) amigas(os) de curso que sempre me acompanharam ao longo desta caminhada. De uma forma muito especial à Adriana Vinhas e Diana Rodrigues por todo o apoio ao longo deste período. Agradeço-vos por tudo. Por todos os sorrisos, gargalhadas, noites em claro, e pela “paciência”. Sem a vossa ajuda, teria sido muito mais difícil, e muito menos divertido! Obrigada!

Agradeço aos meus Pais, sem o apoio dos quais esta tese nunca teria sido possível, por todo o incentivo, amor, carinho e confiança que sempre me deram ao longo de todo o meu percurso académico. A toda a minha família, em especial à minha Avó por todo o apoio e lições de vida.

A todos **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Uma formação adequada da placenta – placentação – é crucial para o sucesso da gravidez e alterações neste processo têm sido associadas a patologias da gravidez tais como pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal. A diabetes *mellitus* (DM) é a doença metabólica mais prevalente nas grávidas e está associada a diversas complicações maternas e fetais, tais como macrossomia e parto prematuro. Pouco se sabe sobre as consequências da DM materna no processo de placentação. Por esse motivo, decidiu-se investigar o efeito da exposição crônica a biomarcadores associados aos dois tipos mais frequentes de DM na gravidez, a DM de tipo 2 e a DM gestacional (insulina, leptina, TNF- α e glicose) na placentação, utilizando uma linha celular de trofoblastos extravilositários humanos de primeiro trimestre (células HTR8/SVneo). A exposição das células HTR8/SVneo durante 24h à insulina (1 nM ou 10 nM) ou TNF- α (10 ng/l ou 100 ng/l) provocou uma diminuição na proliferação celular (avaliada pela incorporação de ^3H -timidina). Em contraste, a leptina e glicose não provocaram alterações significativas neste parâmetro. Relativamente à viabilidade celular (avaliada pelo método do MTT), apenas o TNF- α (100 ng/l; 24h) induziu um pequeno aumento neste parâmetro. Investigando mais profundamente o efeito antiproliferativo da insulina, verificamos que a diminuição da proliferação celular induzida pela insulina (10 nM; 48h) foi semelhante em células com 4 e 7 dias de cultura. Curiosamente, verificamos que a insulina pode eventualmente provocar hiperplasia dessas células, uma vez que diminui o índice de mitose celular (tal como determinado com o ensaio de ^3H -timidina) ao mesmo tempo que aumenta o conteúdo de proteína de cultura (tal como determinado com o ensaio de SRB). Verificamos também que o efeito antiproliferativo de insulina envolve a ativação das vias intracelulares mTOR, PI3K e p38/MAPK. Por outro lado, a exposição à insulina (10 nM; 48h) não mostrou um efeito significativo nem no índice apoptótico nem na capacidade de migração celular. Finalmente, verificamos que os polifenóis resveratrol (2,5 μM) e quercetina (1 μM), os ácidos gordos polinsaturados EPA e DHA (50 μM), o ácido fólico (1 mM) e a sinvastatina (10 μM) não foram capazes de reverter o efeito antiproliferativo da insulina. Em conclusão, ao demonstrar que a insulina, um biomarcador de diabetes na gravidez, possui um efeito antiproliferativo e hiperplásico em trofoblastos extravilositários humanos de primeiro trimestre, os nossos dados sugerem que a hiperinsulinemia poderá provocar uma alteração no processo de placentação.

Palavras-chave: Placenta, Diabetes, Insulina, Trofoblastos extravilositários, Proliferação

ABSTRACT

An adequate formation of the placenta - placentation - is crucial for a successful pregnancy and changes in this process have been associated with pregnancy disorders such as preeclampsia or intrauterine growth restriction. Diabetes is the most prevalent metabolic disease in pregnant women and is associated with several maternal and fetal complications such as macrosomia, abortion or premature delivery. Little is known about the consequences of maternal diabetes in the placentation process. For this reason, we decided to investigate the effect of chronic exposure to biomarkers of the two most common types of diabetes in pregnancy, type 2 diabetes mellitus and gestational diabetes mellitus (insulin, leptin, TNF- α and glucose) in the placentation process, using a first trimester extravillous human trophoblast cell line (HTR8/SVneo cells). Exposure of HTR8/SVneo cells for 24h to insulin (1 nM or 10 nM) or TNF- α (10 ng/l or 100 ng/l) caused a decrease in cell proliferation (measured by ^3H -thymidine incorporation). In contrast, leptin and glucose did not cause significant changes in this parameter. As for cell viability (assessed by the MTT method), only TNF- α (100 ng/mL; 24 h) induced a small increase in this parameter. Further investigation on the antiproliferative effect of the insulin showed that the decrease in cell proliferation induced by insulin (10 nM, 48 h) was similar in 4 and 7 day-old cultures. Interestingly, insulin appears to cause hyperplasia of these cells, since it reduces the cell mitotic index (as determined with the ^3H -thymidine assay) while increasing the culture protein content (as determined by the SRB test). In addition, we observed that the antiproliferative effect of insulin involves the activation of mTOR, PI3K and p38/MAPK intracellular pathways. Also, we verified that exposure to insulin (10 nM; 48) showed no significant effect on the apoptotic index and on cell migration capacity. Finally, the polyphenols resveratrol (2.5 mM) and quercetin (1 mM), the polyunsaturated fatty acids EPA and DHA (50 mM), folic acid (1 mM) and simvastatin (10 μM) were not able to reverse the antiproliferative effect of insulin. In conclusion, by showing that insulin, a biomarker of diabetes in pregnancy, has an antiproliferative and hyperplastic effect on first trimester extravillous human trophoblasts, our data suggest that hyperinsulinemia may cause a change in placentation process.

Keywords: Placenta, Diabetes, Insulin, Extravillous trophoblasts, Proliferation

TRABALHOS CIENTÍFICOS ELABORADOS NO ÂMBITO DA TESE DE MESTRADO

APRESENTAÇÕES DE POSTERS EM CONGRESSOS NACIONAIS:

C.Silva, C.Nunes, A.Correia-Branco, F.Martel. Insulin exhibits an antiproliferative effect in first trimester human extravillous trophoblasts. IJUP' 2015 - 8º Encontro de Jovens Investigadores da Universidade do Porto, Reitoria da Universidade do Porto, Porto – Portugal, 13-15 Maio 2015.

C.Silva, C.Nunes, A.Correia-Branco, J.R.Araújo, F.Martel. A insulina possui um efeito antiproliferativo em trofoblastos extravilositários humanos de primeiro trimestre, com consequências no processo de placentação. 7º Simpósio em Metabolismo, FMUP, Porto – Portugal, 21 Outubro 2015.

PARTICIPAÇÃO EM OUTROS TRABALHOS CIENTÍFICOS

C.Nunes, C.Silva, A.Correia-Branco, F.Martel. The procarcinogenic effect of 17 β -estradiol in MCF-7 cells is not related to interference with glucose cellular uptake. IJUP' 2015 - 8º Encontro de Jovens Investigadores da Universidade do Porto, Reitoria da Universidade do Porto, Porto – Portugal, 13-15 Maio 2015.

C.Nunes, C.Silva, A.Correia-Branco, F.Martel. O efeito pró-carcinogénico de 17 β -estradiol em células MCF-7 não é dependente da interferência com a captação celular de glicose. 7º Simpósio em Metabolismo, FMUP, Porto – Portugal, 21 Outubro 2015.

Carletti J V, Silva C R, Correia-Branco A, Andrade N, Martel F. Influência de diferentes concentrações de ácido fólico na resposta de células trofoblásticas humanas (células BeWo) ao stress oxidativo. 7º Simpósio em Metabolismo, FMUP, Porto – Portugal, 21 Outubro 2015.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Trabalhos científicos elaborados no âmbito da tese de mestrado	ix
Participação em outros trabalhos científicos.....	x
Lista de figuras.....	xv
Lista de abreviaturas	xix
Capítulo I - Introdução.....	1
1.1. A placenta humana.....	3
1.1.1.Desenvolvimento da placenta humana	3
1.1.2. Importância do trofoblasto na placentação	6
1.2. Diabetes na gravidez.....	7
1.2.1. Prevalência.....	8
1.2.2. Patogênese.....	8
1.2.3. Consequências	10
1.2.4. Diagnóstico.....	11
1.2.5. Tratamento da diabetes na gravidez.....	12
1.2.6. Potenciais agentes no tratamento da diabetes na gravidez.....	13
1.2.6.1. Polifenóis.....	13
1.2.6.2. Ácidos gordos polinsaturados	14
1.2.6.3. Ácido fólico	15
1.2.6.4. Estatinas.....	16
Capítulo II - Objetivo.....	17
Capítulo III – Material e Métodos.....	21
3.1. Materiais	23
3.2. Métodos.....	23
3.2.1. Cultura celular (linha celular HTR8/SVneo	23

3.2.2. Tratamento crónico	24
3.2.3. Doseamento de proteínas.....	25
3.2.4. Determinação da proliferação celular – incorporação de ³ H-timidina	25
3.2.5. Determinação da viabilidade celular – atividade da lactato desidrogenase (LDH)	25
3.2.6. Determinação da viabilidade celular – ensaio de MTT	26
3.2.7. Determinação do crescimento celular – ensaio de sulforrodamina B (SRB)	27
3.2.8. Determinação do índice apoptótico – ensaio de TUNEL	27
3.2.9. Determinação da migração – <i>injury assay</i>	28
3.2.10. Cálculos e tratamento estatístico.....	28
Capítulo IV: Resultados	29
4.1. Efeito da exposição crónica (24h) a biomarcadores de diabetes na gravidez na proliferação e viabilidade das células HTR8/SVneo	31
4.1.1. Proliferação	31
4.1.2. Viabilidade (MTT)	32
4.1.3. Viabilidade (LDH)	33
4.2. Efeito da exposição crónica (24-72h) à insulina 10 nM e TNF- α 100 ng/l na proliferação e viabilidade das células HTR8/SVneo	34
4.2.1. Proliferação	35
4.2.2. Viabilidade (MTT)	35
4.2.3. Viabilidade (LDH)	36
4.3. Efeito da exposição crónica (48h) à insulina 10 nM e TNF- α 100 ng/l na proliferação, crescimento de cultura, apoptose e migração das células HTR8/SVneo.....	37
4.3.1. Proliferação	38
4.3.2. Crescimento de cultura	38
4.3.3. Apoptose	39
4.3.4. Migração	40
4.4. Influência de inibidores de vias de sinalização intracelular sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.....	41
4.5. Influência de polifenóis, ácidos gordos polinsaturados, ácido fólico e estatinas sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo	43
4.5.1. Polifenóis.....	43

4.5.2. Ácidos gordos polinsaturados	44
4.5.3. Ácido fólico	45
4.5.4. Sinvastatina	46
Capítulo V: Discussão	49
Capítulo VI: Conclusão e perspectivas futuras	61
Capítulo VII: Referências bibliográficas.....	65

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** Representação esquemática da placenta humana primeiro de trimestre.....4
- Figura 2.** Representação esquemática das três etapas envolvidas no processo de implantação do embrião (aposição, adesão e invasão), demonstrando algumas das moléculas envolvidas.....5
- Figura 3.** Representação esquemática da implantação do blastocisto.....7
- Figura 4.** Representação esquemática das vias de sinalização envolvidas no efeito da insulina (via Pi3K MAPK).....10
- Figura 5.** Fluxograma representativo do diagnóstico e conduta na diabetes na gravidez.....12
- Figura 6.** Representação esquemática da classificação e estrutura das principais classes e subclasses dos polifenóis.....14

Capítulo IV

- Figura 7.** Efeito da exposição crónica (24h) a biomarcadores de diabetes na gravidez na proliferação das células HTR8/SVneo.....32
- Figura 8.** Efeito da exposição crónica (24h) a biomarcadores de diabetes na gravidez na viabilidade das células HTR8/SVneo.....33
- Figura 9.** Efeito da exposição crónica (24h) a biomarcadores de diabetes na gravidez na viabilidade das células HTR8/SVneo.....34

Figura 10. Efeito da exposição crónica (24-72h) à insulina 10 nM ou ao TNF- α 100 ng/l na proliferação das células HTR8/SVneo.....	35
Figura 11. Efeito da exposição crónica (24-72h) à insulina 10 nM ou ao TNF- α 100 ng/l na viabilidade das células HTR8/SVneo.....	36
Figura 12. Efeito da exposição crónica (24-72h) à insulina 10 nM ou ao TNF- α 100 ng/l na viabilidade das células HTR8/SVneo.....	37
Figura 13. Efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (24-72h) na proliferação das células HTR8/SVneo com diferentes tempos de cultura.....	38
Figura 14. Efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (24-72h) no crescimento de culturas de células HTR8/SVneo com diferentes tempos de cultura.....	39
Figura 15. Efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na taxa de apoptose das células HTR8/SVneo.....	40
Figura 16. Efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na migração das células HTR8/SVneo.....	41
Figura 17. Influência de inibidores de vias de sinalização intracelular (ERK/MEK, P38/MAPK, mTOR, Ser473/Thr308, c-JNK e PI3K) sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.....	42
Figura 18. Influência de polifenóis (resveratrol e quercetina) sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.....	44
Figura 19. Influência de ácidos gordos polinsaturados (EPA e DHA) sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.....	45

Figura 20. Influência do ácido fólico sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.....46

Figura 21. Influência da sinvastatina sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.....47

LISTA DE ABREVIATURAS

- **5-MTHF:** 5-metiltetrahidrofolato
- **BM:** Membrana basal
- **CTB:** Citotrofoblasto
- **DHA:** Ácido docosahexaenóico
- **DHFR:** Redutase do dihidrofolato
- **DM:** Diabetes *mellitus*
- **DMG:** Diabetes *mellitus* gestacional
- **EGF:** Fator de crescimento da epiderme
- **EPA:** Ácido eicosapentaenóico
- **ERK:** Cínases reguladas por sinais extracelulares
- **EVT:** Trofoblasto extravilositário
- **GDP:** Difosfato de guanosina
- **GRB2:** Proteína de ligação ao fator de crescimento 2
- **GTP:** Trifosfato de guanosina
- **HB-EGF:** Fator de crescimento EGF de ligação à heparina
- **hCG:** Gonadotropina coriônica
- **hGH:** Hormona de crescimento
- **HMG-CoA redutase:** Redutase da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
- **hPL:** Lactogénio placentário
- **IGF:** Fator de crescimento tipo insulina
- **IGFBP-1:** Proteína 1 de ligação ao fator de crescimento tipo insulina
- **IL-1:** Interleucina 1
- **IL-11:** Interleucina 11
- **IL-6:** Interleucina 6
- **IRS-1:** Substrato 1 do recetor da insulina
- **JNK:** Via da cínase c-JUN terminal
- **LC-PUFA:** Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa
- **LDH:** Desidrogenase do lactato
- **LIF:** Fator inibitório da leucemia
- **MAPK:** Via das cínases de proteínas ativadas por mitogénios

- **MKK:** Cínase da cínase de proteínas ativada por mitogénio
- **MMP:** Metaloproteínases de matriz
- **mTOR:** Alvo da rapamicina nos mamíferos
- **MTT:** 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
- **MVM:** Membrana microvilositária
- **n-3:** Omega-3
- **NF-kB:** Fator nuclear-k
- **P38/MAPK:** Via da cínase de proteína p38 ativada por mitogénios
- **PDK:** Cínase dependente de fosfatidilinosítidos
- **PI3K:** Cínase 3 do fosfatidilinositol
- **PIP₃:** 3,4,5-Trifosfato de fosfatidilinositol
- **PKB:** Cínase de proteínas B
- **PKC:** Proteína cínase C
- **PTGO:** teste de tolerância oral à glucose
- **PTK:** Proteína tirosina cinase
- **rTdT:** *Recombinant Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*
- **Ser473/Thr308:** Via das Serinas 473/treoninas 308
- **SHC:** Proteína transformadora-SHC
- **SHMT:** Hidróximetiltransferase da serina
- **SOS:** Fator de troca de nucleótidos de guanina
- **SRB:** Sulforrodamina B
- **STB:** Sinciciotrofoblasto
- **SV40:** Vírus símio 40
- **TGF-β:** Fator transformador de crescimento beta
- **TIMP:** Inibidor tecidual de metaloproteases
- **TNF-α:** Fator de necrose tumoral alfa
- **TUNEL:** *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling*
- **uPA:** Ativador do plasminogénio urocínase

Capítulo I – Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. A PLACENTA HUMANA

Durante a gravidez a placenta é um órgão essencial para o crescimento e desenvolvimento do feto uma vez que medeia a transferência de oxigénio, iões, água, nutrientes e resíduos metabólicos entre o sistema circulatório materno e fetal (Gude, Roberts et al. 2004; van Dijk and Oudejans 2014). Além disso, a placenta produz ainda uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e hormonas, entre as quais gonadotropina coriónica (hCG), hormona de crescimento (hGH), lactogénio placentário (hPL), (Lager and Powell 2012), leptina (Tessier, Ferraro et al. 2013), progesterona (Staun-Ram and Shalev 2005) e adiponectina (Jones, Jansson et al. 2010) que regulam o desenvolvimento placentário. Este órgão encontra-se também envolvido na proteção imunológica do feto (Rossant and Cross 2001) e funciona como uma barreira à passagem de xenobióticos, infeções e doenças maternas (Gude, Roberts et al. 2004).

1.1.1. DESENVOLVIMENTO DA PLACENTA HUMANA

Após a fertilização, é formada uma célula única (zigoto). O zigoto sofre divisões celulares progressivas atingindo um estado indiferenciado a que se dá o nome de mórula, uma massa sólida de blastómeros. A mórula move-se para o útero onde se forma uma cavidade central cheia de fluido. Nesta fase o embrião é chamado de blastocisto; consiste numa camada periférica de células (trofoblasto) e num lúmen central, conhecido como massa celular interna ou cavidade do blastocisto. O embrião surge a partir da massa celular interna e os trofoblastos são o precursor da placenta (Huppertz 2008).

É a partir do trofoblasto que se inicia a formação da placenta, sendo os vasos maternos invadidos por células trofoblásticas, que por sua vez entram em contacto direto com o sangue materno. Este tipo de estrutura é designado de placenta hemocorial (Forbes and Westwood 2010).

As células estaminais trofoblásticas proliferam e diferenciam-se dando origem aos citotrofoblastos (CTB) (Forbes and Westwood 2010). Os CTB são uma população de células estaminais progenitoras, que proliferam e diferenciam-se continuamente dando origem a um de dois subtipos de células: os trofoblastos extravilositários (EVT) que separam as vilosidades da placenta, migram para o endométrio decidualizado e remodelam a vasculatura uterina materna para otimizar o

fornecimento de oxigénio e nutrientes da placenta para o feto; e o sinciciotrofoblasto (STB), um epitélio multinucleado que possui duas membranas distintas: a membrana microvilositária (MVM) que esta em contato com o sangue materno - e a membrana basal (BM) (Lager and Powell 2012) que esta em contato com o sangue fetal (Figura 1) (Forbes and Westwood 2010).

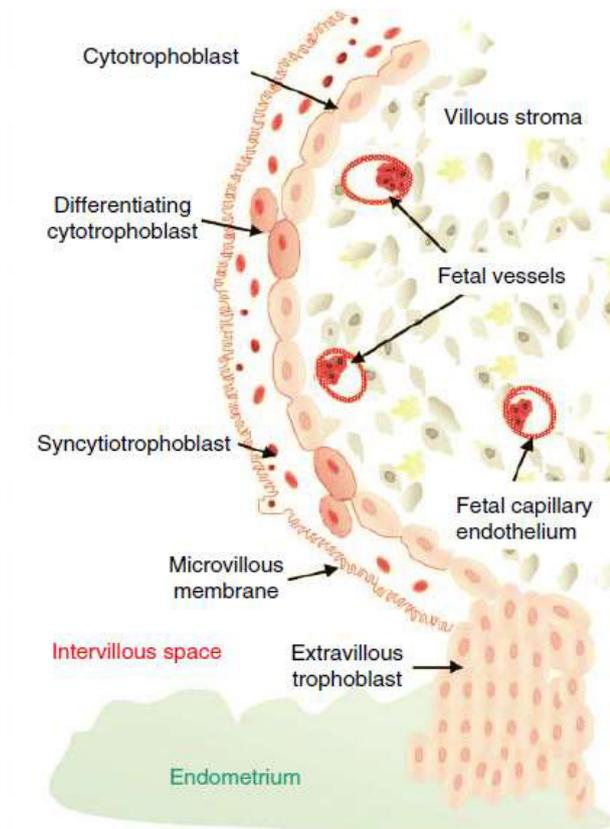


Figura 1. Representação esquemática da placenta humana primeiro de trimestre.

Os CTB proliferam e diferenciam-se em um de dois subtipos celulares, EVT ou STB (Forbes and Westwood 2010).

Posteriormente, seis a sete dias após a fertilização, ocorre a implantação do embrião, que é constituída por três etapas: a primeira etapa é designada de aposição, e é o momento em que ocorre a aderência do blastocisto à parede uterina; é seguida pela etapa de adesão que é caracterizada pelo desenvolvimento de uma ligação mais estável, ou seja há um aumento do contacto físico entre o blastocisto e o epitélio uterino; a última etapa é o processo de invasão, que se inicia com a penetração do STB através do epitélio uterino (Figura 2) (Staun-Ram and Shalev 2005; James, Carter et al. 2012). O STB é o principal tipo de célula envolvida neste processo uma vez que produz enzimas que digerem alguns tecidos no útero, permitindo ao blastocisto penetrar no endométrio (James, Carter et al. 2012).

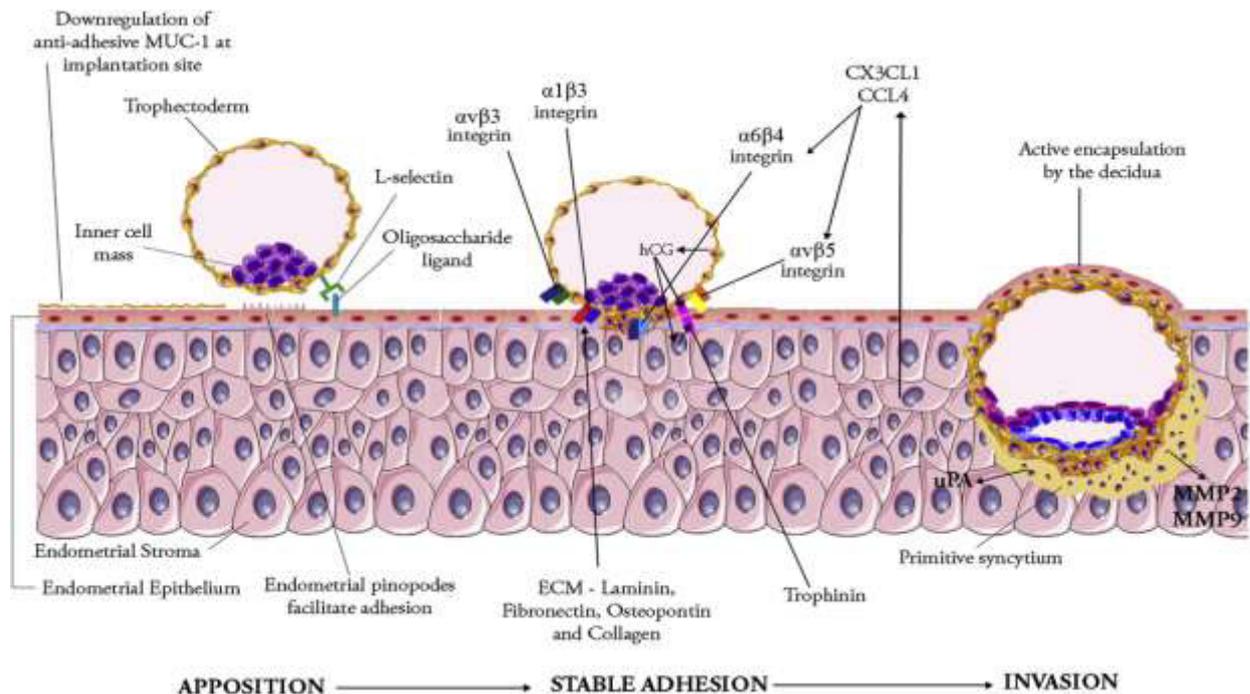


Figura 2. Representação esquemática das três etapas envolvidas no processo de implantação do embrião (aposição, adesão e invasão), demonstrando algumas das moléculas envolvidas.

Inicialmente dá-se a ligação do blastocisto à parede uterina (aposição), seguida pelo desenvolvimento de uma ligação mais estável entre o blastocisto e a parede uterina (adesão) e por último, a penetração dos STB no epitélio uterino (invasão) (James, Carter et al. 2012).

A este processo contínuo e altamente regulado, que se inicia após a fertilização e termina no momento do parto é denominado de placentação. A placentação é iniciada quando o blastocisto entra em contato com o útero logo após a implantação (James, Carter et al. 2012), e envolve a remodelação dos vasos sanguíneos, a fim de fornecer a quantidade necessária de sangue, oxigênio e nutrientes ao feto (Forbes and Westwood 2010). A placentação é um processo dinâmico e altamente regulado, e anomalias neste processo podem prejudicar importantes funções da placenta humana (referidas acima) (Gude, Roberts et al. 2004; van Dijk and Oudejans 2014).

Por exemplo, a placentação pode ser afetada por uma série de anestésicos e analgésicos utilizados durante o parto, antibióticos e antibacterianos usados para tratar infecções, drogas de abuso como morfina, cocaína, álcool e até componentes do fumo do tabaco consumidos por mulheres grávidas, causando uma série de situações adversas como restrição do crescimento fetal, malformações congênitas, nascimento prematuro ou síndrome alcoólica fetal (Sastry 1999; Gavin, Holzman et al. 2009).

1.1.2. IMPORTÂNCIA DO TROFOBLASTO NA PLACENTAÇÃO

A invasão das células trofoblásticas, umas das etapas essenciais no processo de placentação, é iniciada imediatamente após a implantação do embrião e é regulada por uma série de eventos de sinalização. É controlada temporal e espacialmente e ocorre apenas durante o primeiro e o início do segundo trimestre de gravidez. A desregulação do processo de invasão trofoblástica pode levar a um amplo espectro de anomalias na gravidez (Zhu, Pang et al. 2012). Uma redução da proliferação do trofoblasto pode retardar o crescimento e desenvolvimento da placenta, especialmente nas primeiras semanas de gestação (Vambergue and Fajardy 2011), levando a uma maior incidência de complicações da gravidez, incluindo a restrição do crescimento fetal, pré-eclampsia, e até mesmo aborto espontâneo (Hills, Elder et al. 2004; Vambergue and Fajardy 2011; Mayama, Izawa et al. 2013). Em contraste, a proliferação excessiva dos trofoblastos pode também dar origem a complicações na gravidez, resultando em profundas anomalias tais como placenta increta, placenta acreta e placenta percreta (Hills, Elder et al. 2004; Zhu, Pang et al. 2012; Mayama, Izawa et al. 2013). A invasão trofoblástica e migração através da parede uterina são mediadas por interações moleculares e celulares, controladas pelo próprio trofoblasto e pelo microambiente materno (Staun-Ram and Shalev 2005). Uma ampla gama de moléculas é libertada no local da implantação, e desempenham um papel importante na regulação da diferenciação e invasão do trofoblasto (Singh, Chaudhry et al. 2011).

A invasão do trofoblasto envolve a reestruturação da matriz extracelular, e por isso uma ampla gama de moléculas como integrinas, são reguladas pelos EVT e libertadas no local da implantação (Emiliani, Delbaere et al. 2005; Staun-Ram and Shalev 2005). Além disso, os EVT regulam positivamente metaloproteinases de matriz (MMP) e o ativador do plasminogénio urocínase (uPA), que são capazes de degradar a matriz extracelular (Emiliani, Delbaere et al. 2005; Staun-Ram and Shalev 2005). Regulam também os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que estão envolvidos na proliferação e invasão dos EVT (Emiliani, Delbaere et al. 2005; Staun-Ram and Shalev 2005). Vários fatores de crescimento (fator de crescimento da epiderme (EGF), o fator de crescimento EGF de ligação à heparina (HB-EGF), o fator transformador de crescimento beta (TGF- β), a proteína 1 de ligação ao fator de crescimento tipo insulina (IGFBP-1) e o fator de crescimento tipo insulina (IGF)), citocinas (fator inibitório da leucemia (LIF), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 11 (IL-11)) e hormonas (hCG, progesterona e leptina), estão também envolvidos

na invasão e migração dos EVT durante o processo de implantação (Figura 3) (Emiliani, Delbaere et al. 2005; Staun-Ram and Shalev 2005; Singh, Chaudhry et al. 2011).

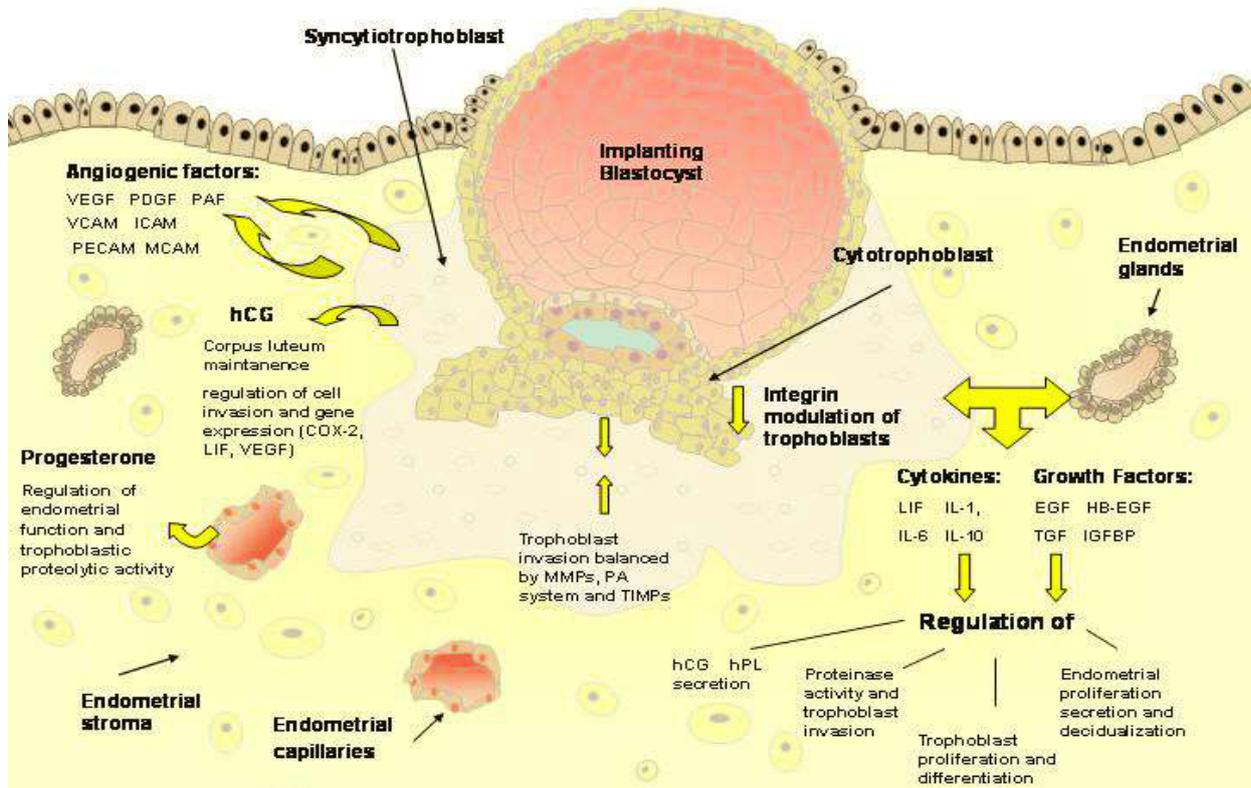


Figura 3. Representação esquemática da implantação do blastocisto.

Neste esquema encontram-se representadas as interações entre células trofoblásticas e células endometriais, bem como os fatores que regulam essa interação, incluindo integrinas, fatores de crescimento, citocinas, hormonas e proteases (Staun-Ram and Shalev 2005).

Durante a gravidez, a apoptose desempenha um papel importante em vários aspetos da biologia placentária incluindo a invasão e diferenciação dos trofoblastos. Numa gravidez normal a apoptose placentária aumenta com o crescimento da placenta e o avanço da gestação; no entanto, em caso de complicações durante a gravidez a apoptose placentária é notavelmente exagerada.

1.2. DIABETES NA GRAVIDEZ

A diabetes é um grupo de doenças metabólicas resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos (Buchanan, Xiang et al. 2007; Metzger, Buchanan et al. 2007).

Existem vários tipos de diabetes; pela sua prevalência, destacam-se três tipos principais: a diabetes *mellitus* tipo 1 (DM tipo1) que é causada pela destruição autoimune das células β do pâncreas

levando geralmente à deficiência total de insulina, e corresponde aproximadamente a 10% dos casos de diabetes, o que equivale a 1% da população mundial (Serrano-Rios, Goday et al. 1999; Vargas, Repke et al. 2010; Magon and Chauhan 2012); a diabetes *mellitus* tipo 2 (DM tipo 2) que é caracterizada por hiperglicemia persistente devido à secreção reduzida de insulina e/ou à resistência à ação da insulina nos tecidos, e corresponde aproximadamente a 85% dos casos de diabetes, o que equivale a 6% da população mundial (Pratley 2013; Forouhi and Wareham 2014); e a diabetes *mellitus* gestacional (DMG), uma doença com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez caracterizada por intolerância à glicose e hiperglicemia, e que metabolicamente é semelhante a DM tipo 2, e corresponde aproximadamente a 5% dos casos de diabetes, o que equivale a 0,5% da população mundial (Ben-Haroush, Yogev et al. 2004; Buchanan, Xiang et al. 2007). A diabetes na gravidez pode ser classificada como diabetes pré-gestacional quando diagnosticada antes de gravidez, e inclui a DM tipo 1 e DM tipo 2, ou como DMG quando diagnosticada durante a gravidez (Vargas, Repke et al. 2010; Pratley 2013).

1.2.1. PREVALÊNCIA

A diabetes *mellitus* é a doença metabólica mais prevalente na gravidez (Negrato and Gomes 2013). Dentro desta, a DMG constitui o tipo mais frequente, constituindo aproximadamente 90% de todos os casos de diabetes na gravidez; os restantes 10% dos casos correspondem a mulheres com diabetes prévia à gravidez (DM tipo 1 e DM tipo 2) (Magon and Chauhan 2012). A DMG é geralmente diagnosticada no segundo ou início do terceiro trimestre de gravidez, e afeta aproximadamente 18% das gestações em todo o mundo (Sacks, Hadden et al. 2012), enquanto a DM tipo 2 afeta 5% das grávidas em todo o mundo (Magon and Chauhan 2012).

1.2.2. PATOGÊNESE

A gestação é um período caracterizado por resistência à insulina em consequência da produção placentária de determinadas hormonas tais como leptina, lactogénio, cortisol, estrogénio, progesterona (Fernandez-Morera, Rodriguez-Rodero et al. 2010) e adiponectina (Jones, Jansson et al. 2010), que contrapõem a ação da insulina, e afetam o metabolismo da glicose (Vambergue and Fajardy 2011). Em gestações normais as células β do pâncreas normalmente aumentam a secreção de insulina para compensar a resistência à insulina. Contudo em grávidas com DM 2 ou

DMG a secreção de insulina por parte das células β do pâncreas não é suficiente para compensar a resistência à insulina, o que promove hiperglicemia materna (Buchanan and Xiang 2005).

Estão descritos vários mecanismos envolvidos na resistência à insulina, nomeadamente: a destruição autoimune das células β do pâncreas, que resulta numa secreção inadequada de insulina (Buchanan, Xiang et al. 2007; Metzger, Buchanan et al. 2007) e também defeitos nas principais vias de sinalização da insulina (via da cínase 3 do fosfatidilinositol (PI3K) e via das cínases de proteínas ativadas por mitogénios (MAPK)) que contribuem para a redução da absorção de glucose (Cusi, Maezono et al. 2000; Buchanan, Xiang et al. 2007; Colomiere, Permezel et al. 2009; Ye, Varamini et al. 2012).

A ativação da via de sinalização PI3K envolve a ligação do substrato 1 do recetor da insulina (IRS-1) ao recetor da insulina, o que resulta na autofosforilação do recetor em resíduos tirosina, e vai permitir a associação do IRS-1 com a PI3K. A associação da PI3K com o IRS-1 leva à fosforilação de determinados fosfolípidos da membrana, principalmente o 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP_3), que leva ao recrutamento da cínase dependente de fosfatidilinosítideos (PDK) e da Akt, também denominada cínase de proteínas B (PKB) (Figura 4) (Taniguchi, Emanuelli et al. 2006). A modificação da Akt/PKB é suficiente para ativar a via de sinalização alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR) (Zhang, Wendel et al. 2012).

A via das MAPK é outra das vias principais de sinalização da insulina. A ativação desta via envolve a proteína transformadora-SHC (SHC), que possui domínios que lhe permite interagir com os recetores de insulina. Uma das mais importantes interações da SHC é a sua ligação com a proteína de ligação ao fator de crescimento 2 (GRB2), uma proteína adaptadora que se liga ao fator de troca de nucleótidos de guanina (SOS). Uma vez formado o complexo SHC/Grb2/SOS, ocorre a dissociação do difosfato de guanosina (GDP) da proteína RAS e ligação do trifosfato de guanosina (GTP). O GTP ativa a proteína RAS, o que inicia uma cascata de fosforilação e ativação das cínases em serina/treonina Raf, MEK, ERK e MAPK (Figura 4) (Cusi, Maezono et al. 2000; Carlson, Koterski et al. 2003; Boucher, Kleinridders et al. 2014).

A ativação da MAPK pode ainda levar à ativação de um subconjunto de 3 cínases: as cínases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2), a cínase c-JUN terminal (JNK) e as cínases p38 (Zarubin and Han 2005; Gehart, Kumpf et al. 2010).

A via das MAPK é ativada independentemente da via PI3K (Boucher, Kleinridders et al. 2014). Ao contrário da via PI3K, que regula os efeitos metabólicos da insulina, a via de sinalização MAPK

medeia os efeitos não metabólicos (nucleares) da insulina (Cusi, Maezono et al. 2000; Carlson, Koterski et al. 2003; Boucher, Kleinridders et al. 2014).

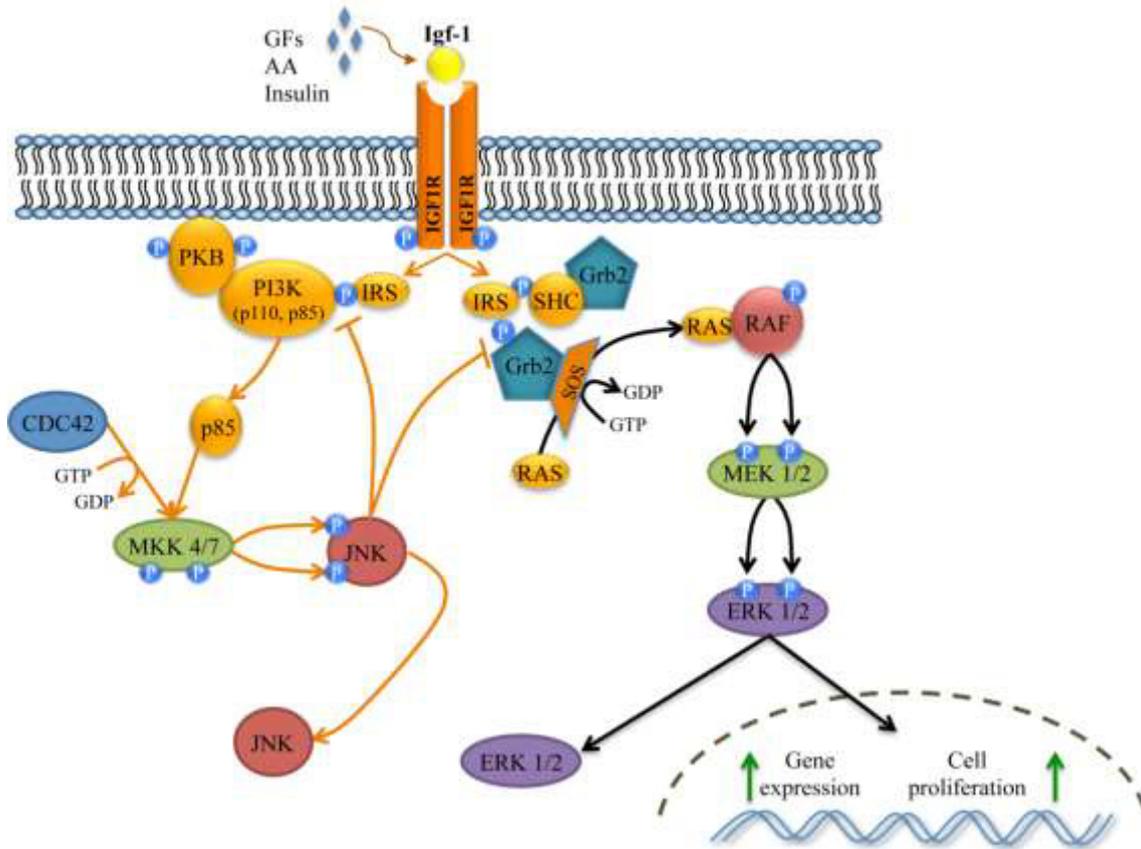


Figura 4. Representação esquemática das vias de sinalização envolvidas no efeito da insulina (via da PI3K e via da MAPK).

A ativação da via de sinalização da insulina PI3K, acontece por ligação da molécula de insulina ao receptor da insulina, que sofre autofosforilação em resíduos de tirosina, permitindo a sua associação com a PI3K, que por sua vez, recruta a proteína PKB.

A via de sinalização MAPK tem início com a autofosforilação do substrato do receptor da insulina IRS-1/IRS-2. O IRS-1/IRS-2 fosforilado forma um complexo com a SHC/GRB2/SOS. Este complexo permite a dissociação da proteína RAS do GDP; a RAS ativada inicia uma cascata de fosforilação da RAF, MEK e ERK. A ativação da via JNK ocorre por meio da subunidade reguladora p85 da via PI3K através de um mecanismo dependente de CDC42 que ativa a cinase de proteínas ativada por mitogénio 4 e 7 (MKK4 e MKK7), levando à ativação da JNK (Vogel 2013).

1.2.3. CONSEQUÊNCIAS

O desenvolvimento/ocorrência de diabetes na gravidez está associado a um risco aumentado de inúmeras complicações a curto e a longo prazo, tanto maternas, como fetais.

A curto prazo os filhos de mulheres afetadas por diabetes na gravidez são mais propensos a desenvolver efeitos perinatais adversos tais como hipocalcemia, hipoglicemia e hiperbilirrubinemia

(Rice, Illanes et al. 2012), policitemia (Tracy L. Setji 2005) e macrosomia, que se caracteriza pelo excesso de peso em recém-nascido, e está fortemente associada a morte fetal, prematuridade e síndrome do stress respiratório. A longo prazo possuem um maior risco para desenvolver obesidade e DM tipo 2 (Yessoufou and Moutairou 2011).

As complicações maternas associadas a gestações com diabetes incluem maior risco para desenvolver complicações como anomalias placentárias (Vambergue and Fajardy 2011) e pré-eclâmpsia (Belkacemi, Lash et al. 2005); a longo prazo, as grávidas com DMG possuem um risco aumentado para desenvolver hipertensão, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, DM tipo 2 e conseqüentemente um aumento de doenças cardiovasculares (Ben-Haroush, Yogev et al. 2004).

1.2.4. DIAGNÓSTICO

As grávidas com DM tipo 2 são aqueles que apresentam um valor de glicemia plasmática em jejum superior a 7,0 mmol/L (126 mg/dl) (Vicente L 2011).

A maioria das grávidas com DMG é assintomática, e o diagnóstico é geralmente realizado pela medição da glicose em jejum e pelo teste de tolerância oral à glucose (PTGO) (Ben-Haroush, Yogev et al. 2004; Rice, Illanes et al. 2012). Todas as grávidas são sujeitas a um teste de glicemia plasmática em jejum, se o valor obtido for entre 5,1 mmol/L (92 mg/dl) e 7,0 mmol/L (126 mg/dl) é considerado DMG, se o valor for $\leq 5,1$ mmol/L (92 mg/dl) é considerada uma grávida sem diabetes (Metzger, Lowe et al. 2008; Vicente L 2011), e é mais tarde submetida ao teste PTGO para confirmação diagnóstica. O Teste PTGO é executado entre as 24-28 semanas de gestação, sendo realizado com sobrecarga de 75 g de glucose durante 2 h, (Ben-Haroush, Yogev et al. 2004; Metzger, Lowe et al. 2008; Rice, Illanes et al. 2012). Estabelece-se o diagnóstico de DMG pelo teste de PTOG quando a grávida apresenta no plasma valores iguais ou superiores aos valores de referência, ou seja, glucose em jejum $\geq 5,1$ mmol/L (92 mg/dl), 1h após a sobrecarga $\geq 10,0$ mmol/L (180 mg/dl), e 2h após a sobrecarga $\geq 8,5$ mmol/L (153 mg/dl) (Figura 5). O diagnóstico faz-se quando um valor anormal de glucose no sangue for superior ou igual aos valores de referência (Ben-Haroush, Yogev et al. 2004; Vicente L 2011; Yessoufou and Moutairou 2011).

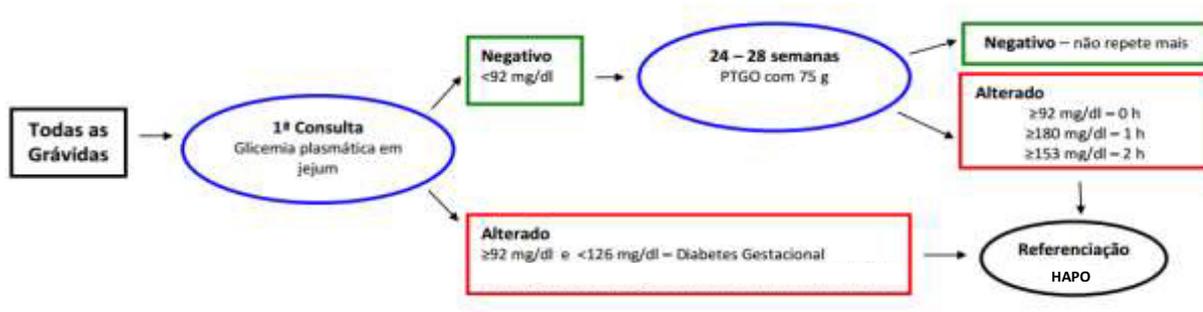


Figura 5. Fluxograma representativo do diagnóstico e conduta na diabetes na gravidez (Vicente L 2011).

1.2.5. TRATAMENTO DA DIABETES NA GRAVIDEZ

O tratamento de mulheres grávidas com diabetes deve ser feito através da regulação dos níveis de glicose, mantendo-os o mais próximos possíveis da normalidade (Berggren and Boggess 2013). Deste modo, existe uma necessidade de controlar a diabetes pré existente, tal como a DM tipo 2 ou no caso da grávida desenvolver DMG, esta, deve ser diagnosticada o mais cedo possível, para que o tratamento possa ser iniciado e adaptado às necessidades da grávida, a fim de minimizar as complicações perinatais e possíveis sequelas (Rice, Illanes et al. 2012).

O tratamento de uma gestante com diabetes na gravidez é iniciado primeiramente com terapia dietética geralmente associada com a prática de exercício físico (Kaaja and Ronnema 2008). Os objetivos da terapia dietética são proporcionar uma nutrição adequada para mãe e para o feto, fornecendo calorias suficientes adequadas para o ganho de peso materno e crescimento fetal (Franz, Bantle et al. 2003).

A terapêutica com insulina é o tratamento mais frequentemente utilizado quando a terapia dietética não consegue manter os níveis de glicose no sangue nas gamas desejadas ou quando há evidência de crescimento excessivo do feto (Kaaja and Ronnema 2008). Como não existem dados que demonstrem um regime de insulina ideal, o tipo e a dose de insulina, deve ser adaptado de forma a atender às necessidades de cada grávida (Tracy L. Setji 2005).

Atualmente, o uso de antidiabéticos orais em mulheres com DMG ou até em grávidas com diabetes pré-gestacional (DM tipo 2) é um assunto controverso, devido à preocupação com a passagem transplacentária de fármacos, e consequentes efeitos teratogênicos que possam eventualmente induzir, durante o desenvolvimento fetal. Dos hipoglicemiantes orais, a glibenclamida não demonstra nenhum dano fetal e aparentemente controla a glicemia de forma equivalente ao

tratamento com insulina (Langer, Conway et al. 2000). A metformina também tem sido utilizada para tratar mulheres grávidas com DMG e DM tipo 2 (Hellmuth, Damm et al. 2000).

1.2.6. POTENCIAIS AGENTES NO TRATAMENTO DA DIABETES NA GRAVIDEZ

Existe atualmente interesse em encontrar um tratamento, mais adequado e menos invasivo que a insulino terapia. Nesse contexto, tem sido relatado que em modelos animais a suplementação com substâncias como as vitaminas C e E (Cederberg, Siman et al. 2001), ácido gímnicos (Kanetkar, Singhal et al. 2007), polifenóis (Singh, Kumar et al. 2013), ácidos gordos polinsaturados (Duttaroy 2009), ácido fólico (Singh, Kumar et al. 2013) ou estatinas (Forbes, Shah et al. 2015) durante a gravidez por si só, ou em combinação com a insulina, ajuda a manter os níveis de glicemia dentro da normalidade, como explicado seguidamente.

1.2.6.1. POLIFENÓIS

Os polifenóis têm propriedades antioxidantes e estão presentes em abundância na nossa dieta, sendo componentes generalizados de frutas, legumes, cereais, leguminosas secas, ou bebidas como chás, café ou vinho (Youl, Bardy et al. 2010). Os polifenóis são fitoquímicos derivados da fenilalanina e contêm um anel aromático com um grupo hidroxilo reativo. De acordo com a sua estrutura, os polifenóis podem ser divididos em diferentes classes: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanos. Os flavonoides podem ainda ser divididos em 7 subclasses: flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianidinas, flavan-3-óis, isoflavonas e calconas (Figura 6) (Araujo, Goncalves et al. 2011).

Os efeitos benéficos dos polifenóis são atribuídos principalmente às suas propriedades antioxidantes, uma vez que atuam como *scavengers* de radicais. Em algumas circunstâncias podem no entanto exibir efeitos pró-oxidantes (Manach, Scalbert et al. 2004). No entanto, os efeitos biológicos dos polifenóis podem ir além da modulação do stresse oxidativo (Scalbert, Johnson et al. 2005). Os polifenóis apresentam também propriedades antidiabéticas (Youl, Bardy et al. 2010) anticancerígenas (Manach, Scalbert et al. 2004) e antiinflamatórias (Cudmore, Ramma et al. 2012), e podem provocar alterações em vias de sinalização intracelulares interagindo com

vias como a via MAPK, que contribui para o crescimento, diferenciação e processos de desenvolvimento (Singh, Kumar et al. 2013).

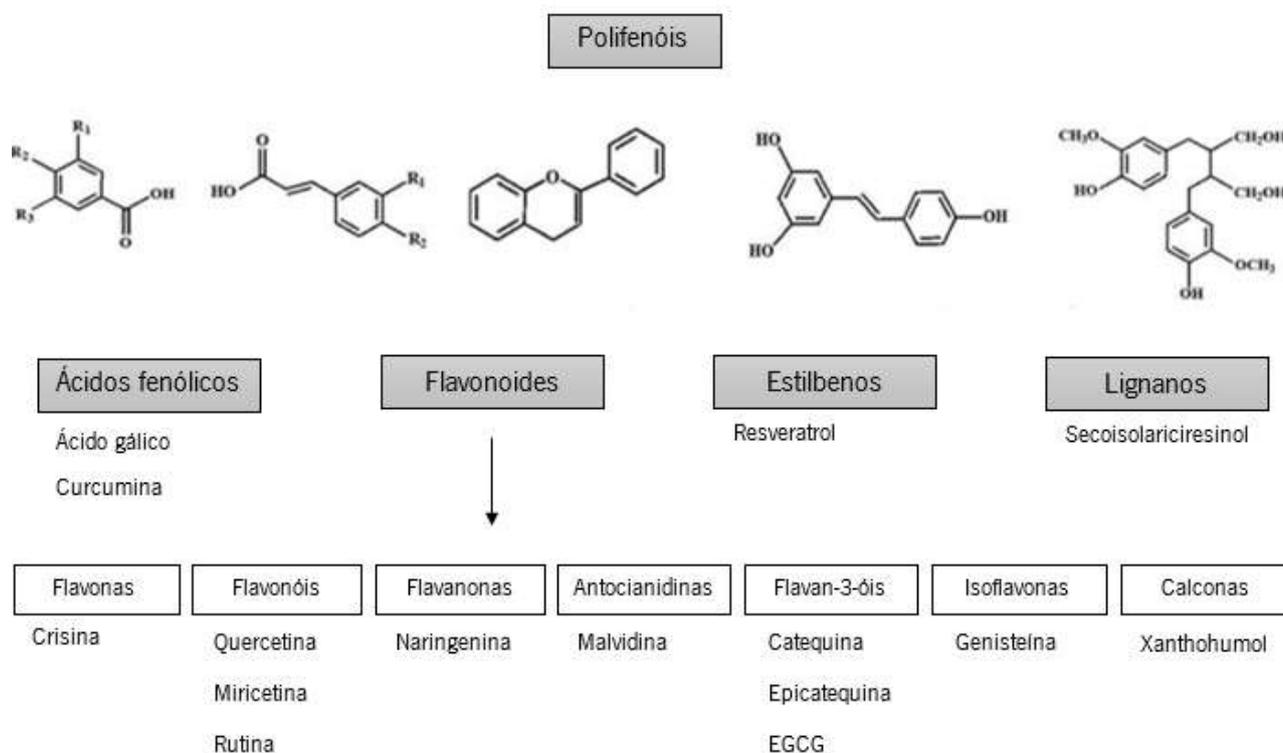


Figura 6. Representação esquemática da classificação e estrutura das principais classes e subclasses dos polifenóis.

Os polifenóis são divididos em 4 classes: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanos. Os ácidos fenólicos constituem cerca de um terço dos compostos polifenólicos encontrados na dieta, sendo particularmente abundantes em frutas ácidas. O ácido gálico e a curcumina são alguns dos ácidos fenólicos mais comuns. Os flavonoides são os polifenóis mais abundantes na dieta humana, e compartilham de uma estrutura básica comum que consiste em dois anéis aromáticos, que são unidos por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado. Os estilbenos contêm dois radicais fenilo ligados por uma ponte metilo de dois carbonos. A maioria dos estilbenos atuam como antifúngicos, sendo sintetizados em resposta a uma infecção ou lesão. O estilbeno mais estudado é o resveratrol. Os lignanos são compostos difenólicos e contêm uma estrutura de 2,3-dibenzilbutano que é formado pela dimerização de dois resíduos de ácido ciânico (adaptado de (Tsoo 2010)).

1.2.6.2. ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS

Os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA) são precursores de eicosanóides e são constituintes essenciais dos lípidos da membrana, importantes para manter a integridade celular (Duttaroy 2009). Os LC-PUFAs, especialmente omega-3 (n-3 PUFAs) têm sido associados ao crescimento e desenvolvimento fetal, e estão ainda envolvidos em efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Basak and Duttaroy 2013; Jones, Mark et al. 2014) .

Dado que várias complicações relacionadas com a placenta, como a restrição do crescimento intrauterino, pré-eclâmpsia e DMG, estão associados com a inflamação placentária, stresse oxidativo e possivelmente, desequilíbrios no aporte de LC-PUFA ao feto, há um interesse considerável no potencial dos n-3 PUFAs como uma intervenção dietética terapêutica para estas desordens (Jones, Mark et al. 2014).

O ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) são n-3 PUFAs com uma variedade de benefícios para a saúde. O DHA é um componente chave em todas as membranas celulares e é encontrado em abundância no cérebro e na retina (Basak and Duttaroy 2013; Zhao, Levy et al. 2014). O EPA e o DHA são também os precursores de vários metabolitos que são potentes mediadores lipídicos, sendo benéficos na prevenção ou tratamento de várias doenças (Swanson, Block et al. 2012), e promovem uma angiogénese placentária adequada, que é importante para o estabelecimento da circulação da placenta e, portanto, para o crescimento e desenvolvimento normal do feto (Basak, Das et al. 2013).

Adicionalmente, o suplemento alimentar materno com PUFAs n-3 durante a gravidez pode exercer efeitos benéficos incluindo a redução da pré-eclâmpsia estimulando a angiogénese placentária (Basak, Das et al. 2013), o aumento da duração da gestação e do crescimento fetal e uma redução no risco de complicações na gravidez (Jones, Mark et al. 2014). Todos estes fatores indicam que n-3 PUFAs como DHA e EPA são necessários no processo de placentação, estimulando a invasão dos trofoblastos de primeiro trimestre (Johnsen, Basak et al. 2011; Basak, Das et al. 2013).

1.2.6.3. ÁCIDO FÓLICO

O folato ou ácido fólico, também conhecido com vitamina B₉, é um nutriente essencial necessário para a replicação do ADN e proliferação celular (Antony 2007), atuando ainda como um substrato para uma série de reações enzimáticas envolvidas na síntese de aminoácidos (Greenberg, Bell et al. 2011) e possuindo também uma função antioxidante (Williams, Bulmer et al. 2011). Durante a gestação, níveis adequados de folato são importantes pois estimulam a maturação, implantação e placentação (Ebisch, Thomas et al. 2007). A importância do ácido fólico durante a gravidez está bem demonstrada pelo facto de a deficiência materna em ácido fólico estar associada a anomalias congénitas (Greenberg, Bell et al. 2011), baixo peso ao nascer e defeitos no tubo neural (espinha bífida e anencefalia) (Keating, Goncalves et al. 2007; Barua, Kuizon et al. 2014).

Encontra-se reportado que a suplementação periconcepcional com ácido fólico permite um melhor desenvolvimento da placenta (Williams, Bulmer et al. 2011), e reduz a incidência de recém-nascidos de baixo peso ao nascer e de defeitos do tubo neural (Barua, Kuizon et al. 2014).

1.2.6.4. ESTATINAS

O rápido aumento da obesidade, síndrome metabólica (Forbes, Shah et al. 2015), hipercolesterolemia, DM tipo 2 e doenças cardiovasculares é um dos principais problemas de saúde do mundo ocidental (Kenis, Tartakover-Matalon et al. 2005; Tartakover-Matalon, Cherepnin et al. 2007). Os indivíduos afetados por estas patologias são frequentemente tratados com estatinas, que atuam inibindo a enzima redutase da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA redutase), enzima limitante da via do mevalonato (Kenis, Tartakover-Matalon et al. 2005; Tartakover-Matalon, Cherepnin et al. 2007), de forma a reduzir os níveis plasmáticos de colesterol e, conseqüentemente, o risco de doenças cardiovasculares (Forbes, Shah et al. 2015).

As estatinas parecem influenciar a proliferação celular, a migração do trofoblasto, a síntese das membranas, o metabolismo e a glicosilação de proteínas, processos que são cruciais para o desenvolvimento normal do embrião e da placenta (Tartakover-Matalon, Cherepnin et al. 2007; Forbes, Shah et al. 2015). Muitos destes processos dependem da função da HMG-CoA redutase; de facto, a inibição da HMG-CoA redutase reduz os níveis de colesterol, que é necessário para o desenvolvimento normal em mamíferos, sendo também um precursor na biossíntese de hormonas importantes para a manutenção da gravidez (Kenis, Tartakover-Matalon et al. 2005).

Um estudo recente realizado em roedores sugere que a administração de estatinas pode ter efeitos benéficos em complicações da gravidez como a pré-eclâmpsia (Forbes, Shah et al. 2015).

Capítulo II – Objetivo

2. OBJETIVO

O crescimento adequado dos trofoblastos, a sua proliferação, diferenciação e morte celular programada são processos cruciais para formar e manter a estrutura da placenta. Alterações nestes processos têm sido associadas a distúrbios de gravidez como a pré-eclâmpsia e a restrição do crescimento intrauterino. A diabetes é a doença metabólica mais prevalente nas grávidas. Os dois tipos mais frequentes de diabetes na gravidez, a DM tipo 2 e principalmente a DMG, estão associadas a hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e a uma inflamação de baixo grau provocada pela libertação de citocinas (como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)), que são sobreexpressas num ambiente diabético, pela placenta (Ben-Haroush, Yogev et al. 2004; Desoye and Hauguel-de Mouzon 2007; Fernandez-Morera, Rodriguez-Rodero et al. 2010). No entanto, pouco se sabe sobre a influência da diabetes no processo de placentação.

Neste contexto, a realização deste projeto prende-se com o objetivo de compreender as alterações que a insulina, leptina, TNF- α e glicose, marcadores associados à diabetes, induzem no processo de placentação. Para tal, foi usada uma linha celular de EVT de primeiro trimestre (células HTR8/SVneo). Os EVT são células altamente especializadas, exibindo um fenótipo proliferativo e invasivo, e são o principal tipo celular envolvido no processo de placentação. Utilizando células HTR8/SVneo, foi estudado inicialmente o efeito da exposição crónica a biomarcadores da diabetes (insulina, leptina, TNF- α e glicose) na proliferação (incorporação de ^3H -timidina) e viabilidade celular (ensaio MTT e LDH). Investigou-se depois com mais profundidade o efeito da insulina, analisando o efeito da exposição crónica a esta hormona no crescimento de cultura (ensaio de SRB), proliferação (incorporação de ^3H -timidina), apoptose (ensaio de TUNEL) e migração (injury assay). Adicionalmente, investigou-se os mecanismos intracelulares envolvidos no efeito da insulina na proliferação (incorporação de ^3H -timidina) das células HTR8/SVneo. Por fim, testou-se a capacidade de polifenóis (resveratrol e quercetina), ácidos gordos polinsaturados (EPA e DHA), ácido fólico e estatinas (sinvastatina) em reverter os efeitos da insulina sobre a proliferação (incorporação de ^3H -timidina) das células HTR8/SVneo.

Capítulo III – Material e Métodos

3.1. MATERIAIS

SB 203580; rapamicina (*Alamone Labs*, Jerusalem, Israel). D-manitol (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Metil-[³H]timidina (³H-timidina; atividade específica 79 Ci/mmol) (*GE Healthcare GmbH*, Freiburg, Alemanha). Leptina recombinante humana (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA). Triton X-100; ácido tricloroacético (TCA); D(+)-glucose; dimetilsulfóxido (DMSO); ácido clorídrico (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). Etanol (*Panreac*, Barcelona, Espanha). 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (*Roche Diagnostics*, Mannheim, Alemanha). Ácido acético (*Scientific Laboratory Supplies*, Wilford, UK). *Dulbecco's Eagle's Medium*; RPMI 1640; soro fetal bovino (FBS); solução de antibiótico/antimicótico (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B); solução de tripsina-EDTA; sinvastatina; albumina de soro bovino (BSA); hidróxido de sódio; ácido fólico; ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanesulfônico (HEPES); sulforodamina B (SRB); 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavenona (quercetina); trans-3,5,40-trihidroxiestilbeno (resveratrol); nicotinamida adenina dinucleótido reduzida (NADH); tris (hidroximetil) aminometano (Tris); LY294002; PD 98059; H7; SP 600125; insulina recombinante humana; fator de necrose tumoral alfa humano (TNF-α); piruvato de sódio; paraformaldeído; tween 20; citrato de sódio; ácido eicosapentaenóico (EPA); ácido docosahexaenóico (DHA); glicerol; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (*Sigma*, St. Louis, MO, EUA).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. CULTURA CELULAR (LINHA CELULAR HTR8/SVneo)

Para a realização do presente trabalho foi utilizada a linha celular HTR8/SVneo, uma linha celular estável de trofoblastos extravilositários humanos de primeiro trimestre, que foi gentilmente cedida pelo Dr. Charles H. Grahm (*Department of Anatomy & Biology, Queen's University at Kingston, Canada*).

A linha celular HTR8/SVneo foi usada entre as passagens número 71 e 118, mantida em atmosfera húmida de 5% CO₂ – 95% de ar, a uma temperatura constante de 37°C e cultivada em meio RPMI 1640 contendo L-glutamina, e suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 1% (v/v) antibiótico/antimicótico. O meio de cultura foi mudado a cada 2-3 dias e a cultura foi replicada a cada 7 dias. A subcultura foi realizada periodicamente, sendo as células removidas

enzimaticamente (0,25% de tripsina-EDTA em PBS, 3 min, 37°C), o split 1:4 e as células plaqueadas em placas de plástico (21 cm², Ø 60 mm, *Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha*).

Para a utilização em experiências de proliferação, viabilidade, crescimento de cultura e migração, as células HTR8/SVneo foram semeadas em placas de plástico de 24 poços (2 cm²; Ø 16 mm; *TPP*[®], Trasadingen, Suíça). Para a determinação da taxa de apoptose, as células foram semeadas em lamelas em placas de 24 poços (2 cm²; Ø 16 mm; *TPP*[®]).

3.2.2. TRATAMENTO CRÓNICO

Para as experiências foram executados tratamentos crónicos das células em cultura com os diferentes compostos a testar durante 24, 48 ou 72h, e depois foi avaliada a proliferação, viabilidade, apoptose, migração celular e crescimento de cultura. Os tratamentos crónicos foram iniciados quando as células em cultura em placas de 24 poços atingiam 70-80% de confluência. Na maior parte das experiências, a proliferação, viabilidade e crescimento de cultura foram avaliadas em culturas com 7 dias; no entanto, em algumas das experiências o crescimento de cultura e a viabilidade foram avaliados em culturas com 4 dias. Para o ensaio de TUNEL, foram utilizadas culturas com 3 dias e a migração foi avaliada em culturas com 7 dias. Em todas as experiências foi utilizado meio sem soro (FBS) 24, 48 ou 72h antes das experiências. Nas experiências em que foi testado o efeito dos ácidos gordos polinsaturados (DHA e EPA), utilizou-se meio sem soro (FBS) suplementado com 1% (w/v) de BSA, 48h antes das experiências.

As concentrações dos compostos a testar foram escolhidas com base em trabalhos anteriores do grupo (Goncalves, Catarino et al. 2012; Araujo, Correia-Branco et al. 2013; Araujo, Correia-Branco et al. 2013; Araujo, Pereira et al. 2013) e em pesquisas bibliográficas (Schulz and Widmaier 2004; Kenis, Tartakover-Matalon et al. 2005; Kooptiwut, Kebede et al. 2005; Tartakover-Matalon, Cherepnin et al. 2007; Hiden, Glitzner et al. 2008; Jia, Liu et al. 2008; Basak and Duttaroy 2013; Mayama, Izawa et al. 2013; Singh, Kumar et al. 2013). Os compostos testados foram dissolvidos em HCl 0,01M (insulina), DMSO (PD 98059, SB 20358, rapamicina, H7, SP 600125, LY 294002, resveratrol, quercetina e sinvastatina), etanol (EPA e DHA), NaOH 0,01M (ácido fólico), manitol (glicose), 0,1% BSA em H₂O (leptina) e 0,1% BSA em PBS (TNF- α). A concentração final dos solventes no meio de cultura foi de 1% (v/v). Os controlos para os compostos foram realizados na presença do respetivo solvente.

3.2.3. DOSEAMENTO DE PROTÉINAS

As proteínas existentes nas células em cultura foram doseadas segundo o protocolo descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA).

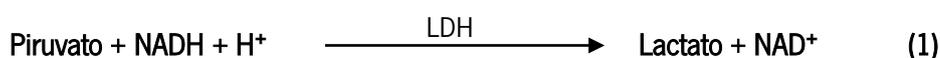
3.2.4. DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR – INCORPORAÇÃO DE ³H-TIMIDINA

O efeito dos compostos na taxa de proliferação celular foi determinado pelo ensaio de incorporação de ³H-timidina. O ensaio de incorporação de ³H-timidina consiste na incorporação de um nucleósido radioativo (³H-timidina) nas novas cadeia de ADN durante a mitose.

Para tal, as células HTR8/SVneo foram cultivadas em placas de 24 poços e submetidas a tratamento crónico com os diferentes compostos. Nas últimas 5h de tratamento, as células foram incubadas com ³H-timidina 0,025 µCi/ml a 37°C, em meio de cultura isento de soro. Findo o tempo de incubação, as células foram lavadas com 300 µl de TCA 10% durante 1h a 4°C, de forma a remover o excesso de ³H-timidina, e secas durante 30 min. Seguidamente as células foram lisadas com 280 µl de NaOH 1M durante 15 min. Finalmente a radioatividade das amostras foi quantificada por cintilação líquida.

3.2.5. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR – ATIVIDADE DA DESIDROGENASE DO LACTATO (LDH)

O efeito dos compostos na viabilidade das células HTR8/SVneo foi avaliado através da medição da atividade da desidrogénese do lactato (LDH), tal como descrito por Bernt e Bergmeyer (1974). A quantificação da libertação da enzima intracelular LDH para o meio extracelular foi utilizada para calcular a viabilidade celular, sendo este marcador um marcador estável que se correlaciona linearmente com a morte celular. A atividade desta enzima foi determinada espectrofotometricamente pela taxa de oxidação do NADH, segundo a equação (1):



Para este ensaio as células foram cultivadas em placas de 24 poços e submetidas a tratamentos crônicos com os diferentes compostos. Após o tratamento, retirou-se o meio de cultura das células HTR8/SVneo, e a 50 µl desse meio foram adicionados 1,5 ml de solução fosfato/piruvato (48 mM/0,6 mM); seguidamente, foi adicionada à mistura 25 µl de solução de NADH (0,18 mM). Os valores de absorvância foram medidos durante 2 min a 340 nm, e foi calculada a taxa de redução de absorvância durante a redução de piruvato a lactato. O processo acima descrito foi repetido com o lisado celular total para determinar a atividade da LDH total. Para isso, as células provenientes dos controlos foram solubilizadas com 0,5 ml de 0,1% (v/v) Triton X -100 (em 5 mM Tris.HCl, pH 7,4), e incubadas durante 30 min a 37°C. A atividade da LDH foi adicionada à atividade da LDH libertada a partir dos controlos, sendo que esta atividade total foi considerada representar 100% de morte celular. A atividade da LDH presente no meio extracelular em cada amostra foi calculada como percentagem da atividade total.

3.2.6. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO DE MTT

O efeito dos compostos na viabilidade das células HTR8/SVneo foi também avaliado por um outro método, o ensaio de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (Mosmann 1983). O ensaio MTT é um método colorimétrico, e baseia-se na quantificação de cristais de formazano (cor púrpura), originados pela redução do composto MTT. A redução dá-se por desidrogenases mitocondriais, nas células metabolicamente ativas/viáveis, permitindo assim avaliar a atividade metabólica das células, por análise espectrofotométrica, e correlacionar com a viabilidade celular. Desta forma, quanto mais cristais se formarem, maior o número de células viáveis.

Para este ensaio as células foram cultivadas em placas de 24 poços e submetidas a tratamentos crônicos com os diferentes compostos. Após o período de tratamento, as células foram incubadas durante 3h a 37°C em 500 µl de meio de cultura isento de soro, com 0,5 mg/ml de MTT. Findo este tempo de incubação com a solução de MTT, as células foram lisadas por adição de 200 µl de DMSO, seguido de agitação da placa durante 10 min à temperatura ambiente. A absorvância em cada poço foi determinada a 540 e 660 nm. A absorvância a 660 nm corresponde à absorção de luz inespecífica e foi subtraída da absorvância a 540 nm de forma a obter o valor específico de cristais de formazano derivados da redução do MTT, que é proporcional ao número de células viáveis com mitocôndrias ativas

3.2.7. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CULTURA – ENSAIO DE SULFORRODAMINA B (SRB)

O efeito da insulina no crescimento da cultura de células HTR8/SVneo foi avaliado pelo ensaio de SRB, que se baseia na capacidade da sulforadamina B, um corante ácido de cor púrpura, se ligar electrostaticamente a aminoácidos básicos das proteínas celulares, previamente fixadas com ácido tricloroacético (TCA). Deste modo, quanto maior o número de células, maior a quantidade de proteínas expostas e, conseqüentemente, maior a quantidade de SRB que se liga a essas proteínas.

Para este ensaio as células foram cultivadas em placas de 24 poços e submetidas a tratamentos crônicos com insulina. Após o período de tratamento, foi adicionado ao meio de cultura de cada poço (500 µl) 62,5 µl de ácido tricloroacético (TCA) 50% (w/v) para fixar as células (1h a 4°C). Seguidamente as células foram lavadas com água corrente, de forma a remover o TCA e secas ao ar. Depois de estarem completamente secas, as placas foram coradas com 0,4% (w/v) SRB dissolvido em 1% (v/v) de ácido acético durante 15 min à temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas novamente com ácido acético 1% (v/v), para remover o corante residual e secas novamente ao ar. Por fim adicionaram-se 375 µl de solução Tris NaOH a 10 mM (pH 10,5), e o corante incorporado foi dissolvido, originando uma solução corada. A absorvância de cada poço foi determinada a 540 nm; as amostras foram diluídas de modo a obter valores de absorvância inferiores a 0,7.

3.2.8. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE APOPTÓTICO – ENSAIO DE TUNEL

O efeito da insulina na taxa de apoptose das células HTR8/SVneo foi determinado pelo ensaio de TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling*) que permite a avaliação da ocorrência de morte celular por apoptose. Baseia-se na incorporação, catalisada pela enzima rTdT (*Recombinant Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*), de nucleotídeos marcados com fluorocromos nas regiões de quebra do ADN, fenómeno associado ao processo de morte celular por apoptose. Previamente aos ensaios de TUNEL, realizados recorrendo ao kit *In situ cell death detection* (*Roche Diagnosticts, Mannheim, Alemanha*) e utilizado de acordo com as instruções do fabricante, as células foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamelas (previamente lavadas com etanol 70% e deixadas 10 min sobre os raios UV) e submetidas a tratamentos crônicos com

insulina. Após o período de tratamento, removeu-se o meio de cultura contido nas placas e fixou-se as células com uma solução de 4% (w/v) paraformaldeído em PBS durante 30 min. De seguida, lavou-se, duas vezes, com PBS (1x), durante 5 min cada. As células foram depois permeabilizadas com uma solução de Triton X-100 0,1% (v/v) durante 2 min, a 4°C. Novamente, efetuaram-se duas lavagens com PBS (1x), de 5 min cada e incubou-se com 20 µl de *fluorescein isothiocyanate-conjugated dUTP* durante 1h a 37°C (protegido da luz). De seguida, procedeu-se novamente a duas lavagens com PBS (1x), durante 5 min cada. Seguidamente, para marcar os ácidos nucleicos, adicionou-se 20 µl de DAPI (0,5 µg/ml em metanol) durante 5 min. Finalmente, realizou-se duas lavagens com PBS-T em PBS (1x), durante 5 min e montaram-se as lamelas em glicerol em PBS (1x). As imagens foram analisadas posteriormente por microscopia de fluorescência (Olympus, BH-2; *Southall Middlesex*, UK). O índice apoptótico foi calculado como o número de células apoptóticas (em % do controlo).

3.2.9. DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR – *INJURY ASSAY*

O efeito da insulina na migração das células HTR8/SVneo foi avaliado pelo método *injury assay*, que visa avaliar a taxa de migração celular. Para tal, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, e submetidas a tratamento crónico com insulina durante 48h. Ao final de 24h, o tratamento com insulina foi renovado e foi feito um risco vertical, em cada poço, com o auxílio de uma ponta de pipeta de 20 µl estéril, de forma a fazer uma “lesão”. A análise da migração foi realizada por meio de fotografias tiradas no tempo zero, imediatamente após a renovação do tratamento, e ao fim de 6, 12 e 24h. A quantificação das imagens foi realizada por análise através do *software* ImageJ versão 1.44.

3.2.10. CÁLCULOS E TRAMENTO ESTATÍSTICO

Os valores são expressos como médias aritméticas com erro padrão da média (SEM). O valor de n representa o número de réplicas de pelo menos duas experiências realizadas.

A análise estatística da diferença entre dois grupos foi avaliada pelo teste t *Student*.

A análise estatística da diferença entre vários grupos foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste *Student-Newman-Kleus*.

As diferenças são consideradas significativas sempre que $P < 0,05$.

Capítulo IV – Resultados

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÓNICA (24H) A BIOMARCADORES DE DIABETES NA GRAVIDEZ NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DAS CÉLULAS HTR8/SVneo

De forma a alcançar o objetivo proposto foi necessário inicialmente estudar o efeito da exposição crónica a biomarcadores de diabetes na gravidez em parâmetros como a proliferação (por avaliação da incorporação de ³H-timidina) e viabilidade celular (recorrendo aos ensaios de MTT e LDH), numa linha celular humana de trofoblastos extravilositários de primeiro trimestre. Para tal, foi utilizada a linha celular HTR8/SVneo, e testados vários compostos cujos níveis elevados estão associados à diabetes na gravidez (insulina, leptina, TNF- α e glicose) em diferentes concentrações. A linha celular HTR8/SVneo foi assim exposta à insulina 0,1 nM, 1 nM, ou 10 nM, à leptina 25 ng/ml ou 100 ng/ml, ao TNF- α 10 ng/l ou 100 ng/l ou à glicose 20 mM em meio de cultura sem soro (FBS) durante 24h. As concentrações testadas foram escolhidas com base em trabalhos desenvolvidos pelo grupo anteriormente e na literatura consultada (já referenciada nos Métodos). A proliferação e a viabilidade foram avaliadas em culturas com 7 dias.

4.1.1. PROLIFERAÇÃO

A Figura 7 demonstra o resultado obtido relativamente à incorporação de ³H-timidina, após tratamento das células com 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM de insulina, 25 ng/ml ou 100 ng/ml de leptina, 10 ng/l ou 100 ng/l de TNF- α e 20 mM de glicose. Ao analisar os resultados é possível verificar que a insulina induz uma diminuição da proliferação de forma dependente da concentração, sendo que a redução da proliferação causada pela insulina 1 nM (9,2%) ou 10 nM (19%) se mostrou significativa. Relativamente ao TNF- α , ambas as concentrações testadas (10 ng/l (10%) e 100 ng/l (8,6%)) originaram uma redução da proliferação nas células HTR8/SVneo. A leptina e a glicose não originaram alterações significativas na proliferação.

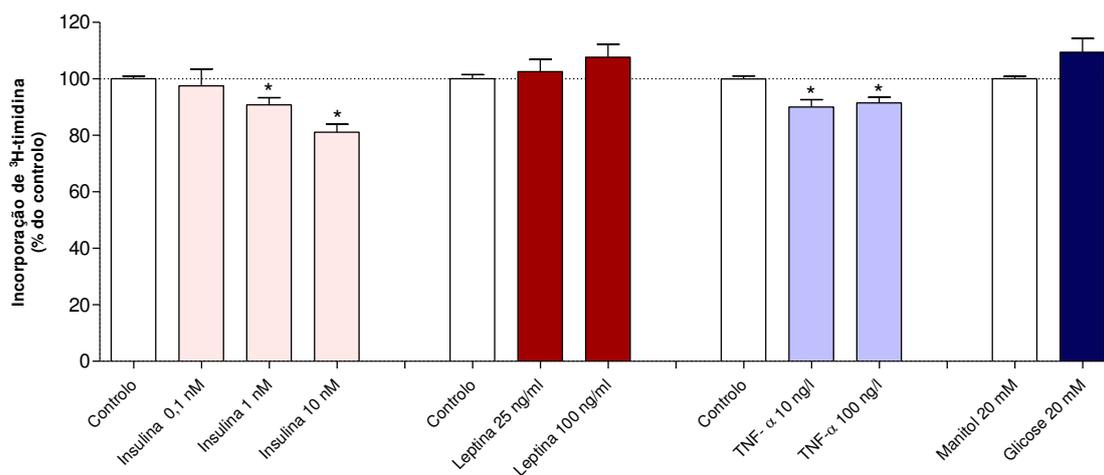


Figura 7 – Efeito da exposição crónica (24h) a biomarcadores de diabetes na gravidez na proliferação das células HTR8/SVneo.

A proliferação foi determinada pela incorporação de ³H-timidina em culturas com 7 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 0,1 nM (n=6), 1 nM (n=11) ou 10 nM (n=9), leptina 25 ng/ml ou 100 ng/ml (n=6), TNF-α 10 ng/l (n=9) ou 100 ng/l (n=13) e glicose 20 mM (n=8) durante 24h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM *Significativamente diferente do controlo (p<0,05).

4.1.2. VIABILIDADE (MTT)

A viabilidade da linha celular HTR8/SVneo exposta às concentrações de 0,1 nM, 1 nM ou 10 nM de insulina, 25 ng/ml ou 100 ng/ml de leptina, 10 ng/l ou 100 ng/l de TNF-α e 20 mM de glicose foi avaliada pelo ensaio de MTT. Observando a Figura 8, é possível verificar que apenas o tratamento com 100 ng/l TNF-α originou um aumento significativo (de cerca de 9,1%) na viabilidade celular. Relativamente aos outros compostos, não são visíveis alterações significativas neste parâmetro.

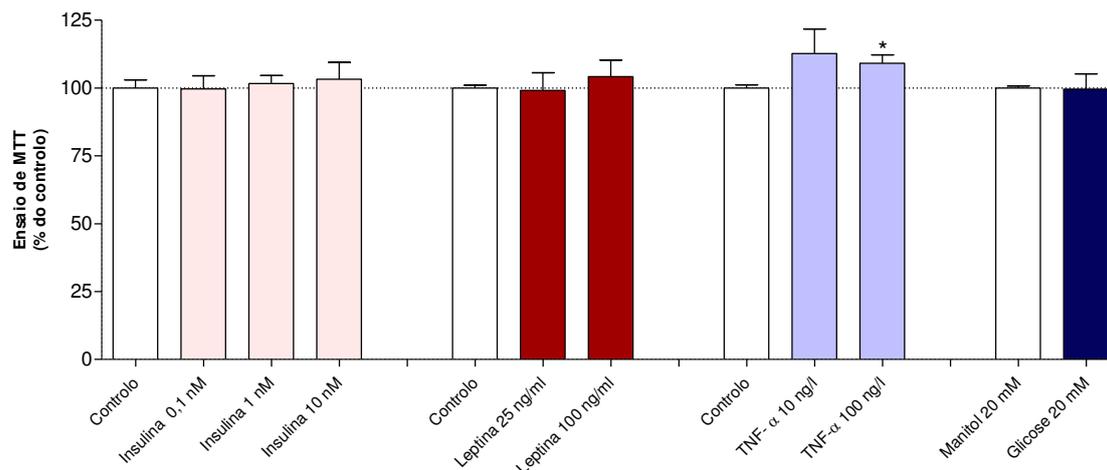


Figura 8 – Efeito da exposição crônica (24h) a biomarcadores de diabetes na gravidez na viabilidade das células HTR8/SVneo.

A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT em culturas com 7 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 0,1 nM (n=8), 1 nM (n=8) ou 10 nM (n=7), leptina 25 ng/ml ou 100 ng/ml (n=11), TNF-α 10 ng/l (n=13) ou 100 ng/l (n=14) e glicose 20 mM (n=8) durante 24h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM *Significativamente diferente do controle (p<0,05).

4.1.3. VIABILIDADE (LDH)

Uma vez que o MTT é um método indireto que avalia a atividade metabólica das células, utilizou-se outro método, a quantificação da atividade da desidrogenase do lactato (LDH) extracelular, para estudar a viabilidade. Assim, a linha celular HTR8/SVneo foi igualmente exposta a diferentes concentrações de compostos associados a diabetes na gravidez (0,1 nM, 1 nM ou 10 nM de insulina, 25 ng/ml ou 100 ng/ml de leptina, 10 ng/l ou 100 ng/l de TNF-α e 20 mM de glicose), e a viabilidade celular foi avaliada pelo método LDH. Conforme demonstra a Figura 9, nenhuma das concentrações escolhidas para os compostos afetaram a integridade da membrana celular, e assim a viabilidade celular.

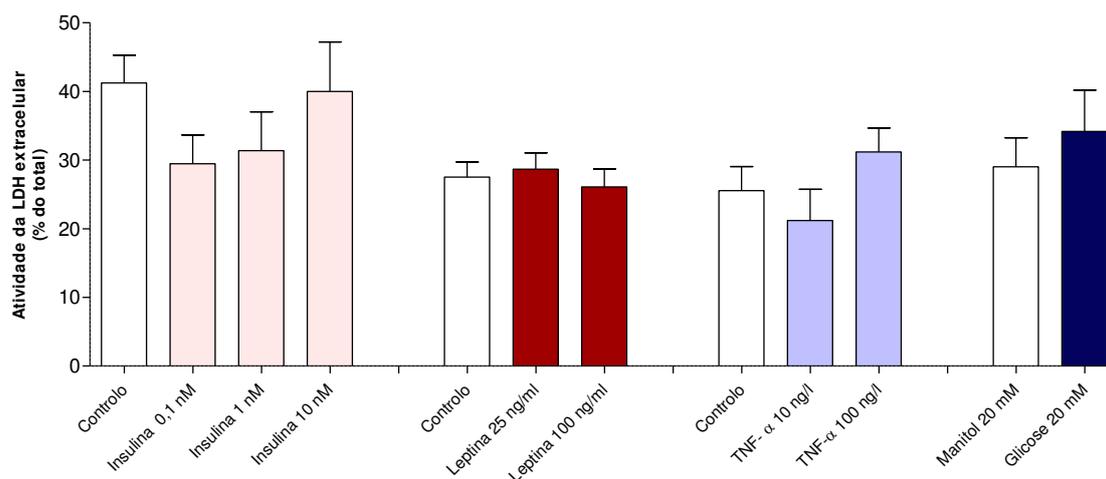


Figura 9 – Efeito da exposição crónica (24h) a biomarcadores de diabetes na gravidez na viabilidade das células HTR8/SVneo.

A viabilidade celular foi determinada pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato (LDH) extracelular em culturas com 7 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 0,1 nM (n=9), 1 nM (n=9) ou 10 nM (n=10), leptina 25 ng/ml ou 100 ng/ml (n=17), TNF-α 10 ng/l (n=8) ou 100 ng/l (n=12) e glicose 20 mM (n=9) durante 24h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM.

4.2. EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÓNICA (24-72H) À INSULINA 10 nM E TNF-α 100 ng/l NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DAS CÉLULAS HTR8/SVneo

Uma vez que a exposição à insulina 10 nM e ao TNF-α 100 ng/l durante 24h originaram uma diminuição da proliferação significativa e o TNF-α um aumento igualmente significativo na viabilidade celular (ver acima), testou-se o efeito de uma exposição crónica mais prolongada à insulina 10 nM e ao TNF-α 100 ng/l, tendo-se determinado tal como na situação anterior, a proliferação por incorporação de ³H-timidina e a viabilidade celular pelo ensaio de MTT e LDH em células com 7 dias de cultura. Para tal, as células HTR8/SVneo foram incubadas na presença ou ausência de insulina 10 nM ou TNF-α 100 ng/l em meio de cultura sem soro (FBS), durante 24, 48 ou 72h.

4.2.1. PROLIFERAÇÃO

Na Figura 10 estão representados os resultados obtidos relativamente à incorporação de ^3H -timidina. A incubação com 10 nM de insulina ou 100 ng/l de TNF- α por 24h causou uma redução na proliferação celular de cerca de 19% e 9%, respetivamente. Já a exposição a 10 nM de insulina durante 48h causou uma diminuição bastante acentuada (36%) na proliferação celular, e curiosamente um aumento de cerca de 11% após 72h de exposição. Por outro lado, a exposição com TNF- α 100 ng/l durante 48 e 72h mostrou-se desprovida de qualquer efeito significativo na proliferação celular.

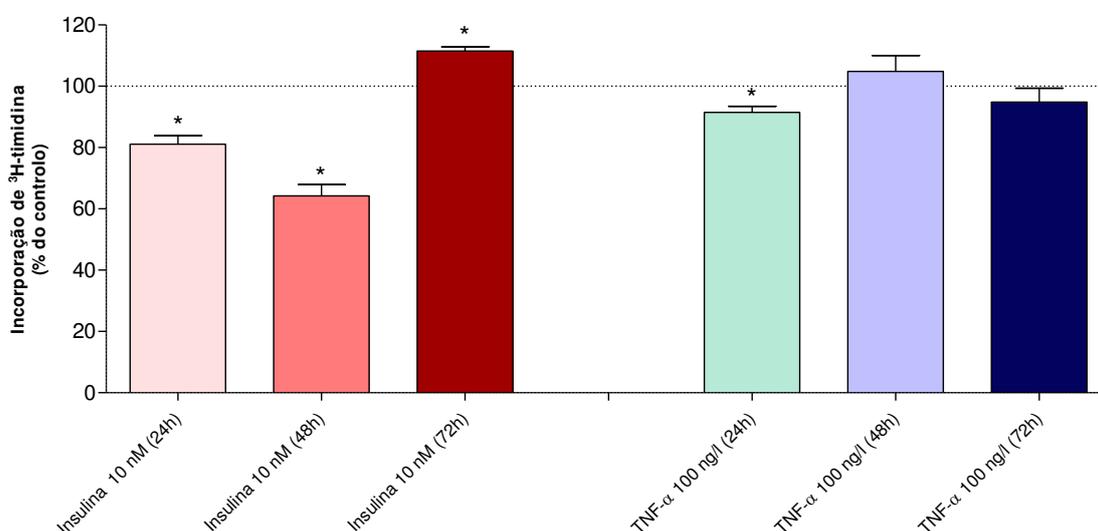


Figura 10 – Efeito da exposição crónica (24-72h) à insulina 10 nM ou ao TNF- α 100 ng/l na proliferação das células HTR8/SVneo.

A proliferação foi determinada pela incorporação de ^3H -timidina em culturas com 7 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM (n=8-9) ou TNF- α 100 ng/l (n=9-13) durante 24, 48 ou 72h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas \pm SEM *Significativamente diferente do controlo (p<0,05).

4.2.2. VIABILIDADE (MTT)

Na Figura 11 estão representados os resultados obtidos pelo ensaio de MTT, após incubação com 10 nM de insulina ou 100 ng/l de TNF- α por 24, 48 ou 72h. Com a exceção da incubação com 100 ng/l de TNF- α durante 24h, que causou um aumento significativo (9%) na viabilidade celular, nenhuma das outras condições foi capaz de induzir um efeito significativo na viabilidade celular avaliada por este método.

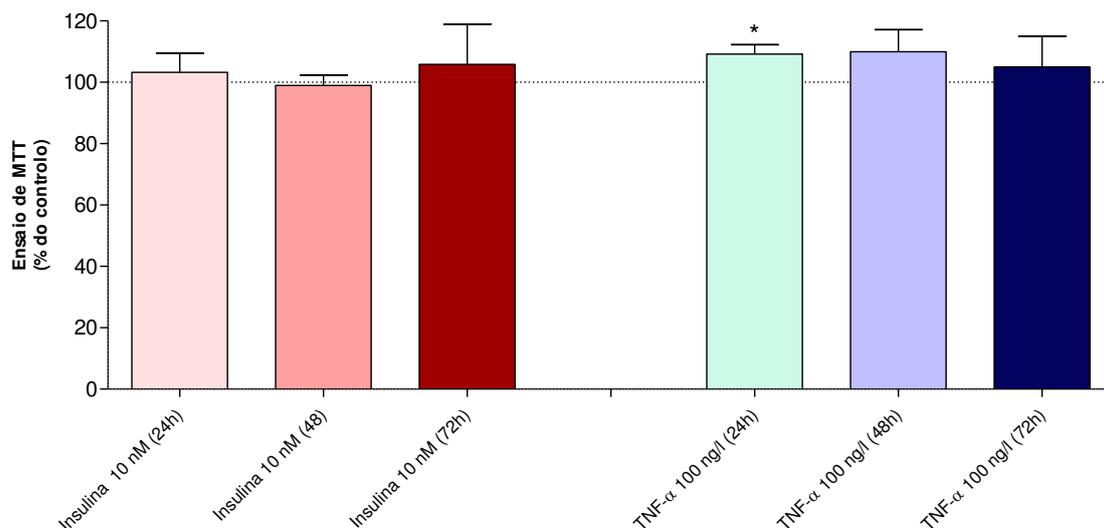


Figura 11 – Efeito da exposição crônica (24-72h) à insulina 10 nM ou ao TNF-α 100 ng/l na viabilidade das células HTR8/SVneo.

A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT em culturas com 7 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência e presença de insulina 10 nM (n=7) ou TNF-α 100 ng/l (n=8-14) durante 24, 48 ou 72h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM *Significativamente diferente do controle (p<0,05).

4.2.3. VIABILIDADE (LDH)

Para estudar o efeito da exposição crônica à insulina 10 nM ou TNF-α 100 ng/l na viabilidade das células HTR8/SVneo, para além do ensaio de MTT, recorreu-se ao ensaio de LDH. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 12, revelam que nem a exposição a 10 nM de insulina nem a exposição a 100 ng/l de TNF-α durante 24, 48 e 72h alteram significativamente este parâmetro, indicando que nenhum dos compostos testados durante os tempos escolhidos afetaram a integridade da membrana celular, e assim a viabilidade celular.

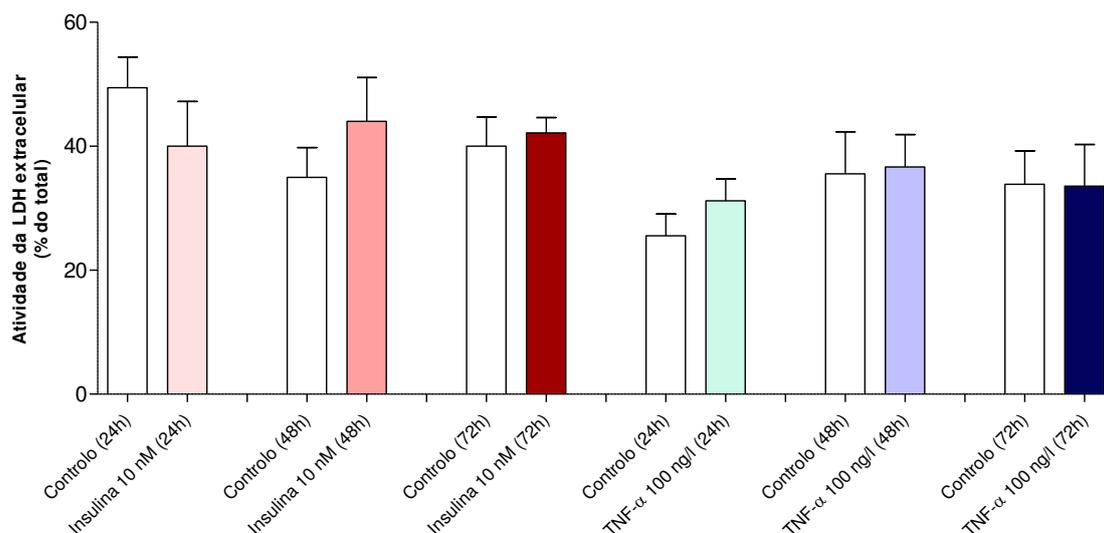


Figura 12 – Efeito da exposição crónica (24-72h) à insulina 10 nM ou ao TNF- α 100 ng/l na viabilidade das células HTR8/SVneo.

A viabilidade celular foi determinada pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato (LDH) extracelular em culturas com 7 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM (n=8-10) ou TNF- α 100 ng/l (n=9-12) durante 24, 48 ou 72h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas \pm SEM.

4.3. EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÓNICA (48H) À INSULINA 10 nM NA PROLIFERAÇÃO, CRESCIMENTO DE CULTURA, APOPTOSE E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS HTR8/SVneo

Analisando os resultados apresentados acima é possível observar que o tratamento com 10 nM de insulina durante 48h foi capaz de causar uma redução bastante significativa na proliferação celular, nas células HTR8/SVneo. Por este motivo decidimos utilizar esta concentração em todas as experiências seguintes. Assim, na série seguinte de experiências, e com base nos resultados anteriores, propusemo-nos estudar mais profundamente o efeito da insulina na proliferação celular, avaliando o efeito crónico da insulina 10 nM (24h, 48h e 72h) na proliferação celular e no crescimento da cultura, em culturas com 4 e com 7 dias de cultura, recorrendo ao ensaio de incorporação de ^3H -timidina e ao ensaio SRB, respetivamente. Para além disso, avaliamos o efeito da insulina 10 nM (48h) na apoptose e na migração celular, através do ensaio de TUNEL e do *injury assay*, respetivamente.

4.3.1. PROLIFERAÇÃO

Para estudar o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM na proliferação das células HTR8/SVneo, recorreu-se ao ensaio de incorporação de ^3H -timidina. Este método, determina o índice mitótico. Por análise da Figura 13, foi observado uma diminuição de 18% na proliferação celular após uma exposição de 48h em células com 4 dias de cultura com 10 nM de insulina. A exposição durante 24 e 72h à insulina mostrou-se desprovida de efeito. Relativamente às células com 7 dias de cultura, foi confirmado o efeito inibitório (13%) após a exposição à insulina 48h; a exposição a 10 nM de insulina durante 24 e 72h não mostrou um efeito significativo.

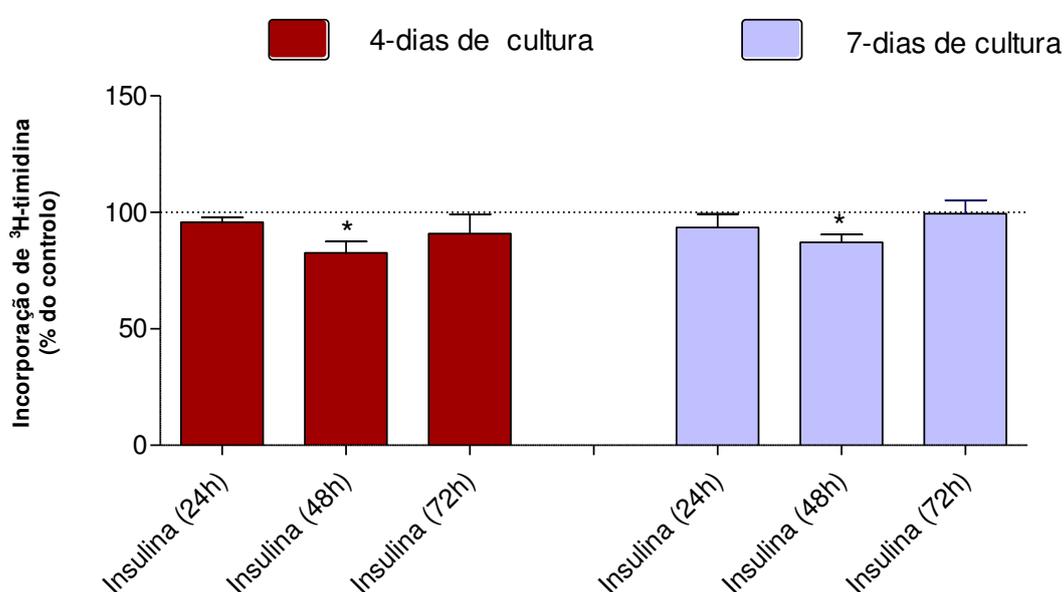


Figura 13 – Efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (24-72h) na proliferação das células HTR8/SVneo com diferentes tempos de cultura.

A proliferação foi determinada pela incorporação de ^3H -timidina em culturas com 4 ou 7 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM durante 24, 48 ou 72h (n=6-13). Os resultados são apresentados como médias aritméticas \pm SEM *Significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$).

4.3.2. CRESCIMENTO DA CULTURA

Para estudar o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM no crescimento de cultura das células HTR8/SVneo recorreu-se ao ensaio de SRB. Este método, tal como descrito na seção Métodos, estima a quantidade de células de acordo com o seu conteúdo proteico. A Figura 14, curiosamente ao contrário dos resultados observados na proliferação celular (Figura 13), mostra que em culturas

com 4 dias, uma exposição a 10 nM de insulina durante 48h causou um aumento de 20% no crescimento de cultura, e que nenhum efeito significativo foi observado após 24 e 72h de exposição a 10 nM de insulina. Já em culturas com 7 dias, foi notória uma diminuição de 15% no crescimento de cultura às 24h, e curiosamente um aumento de 12% e 17% às 48 e 72h, respetivamente.

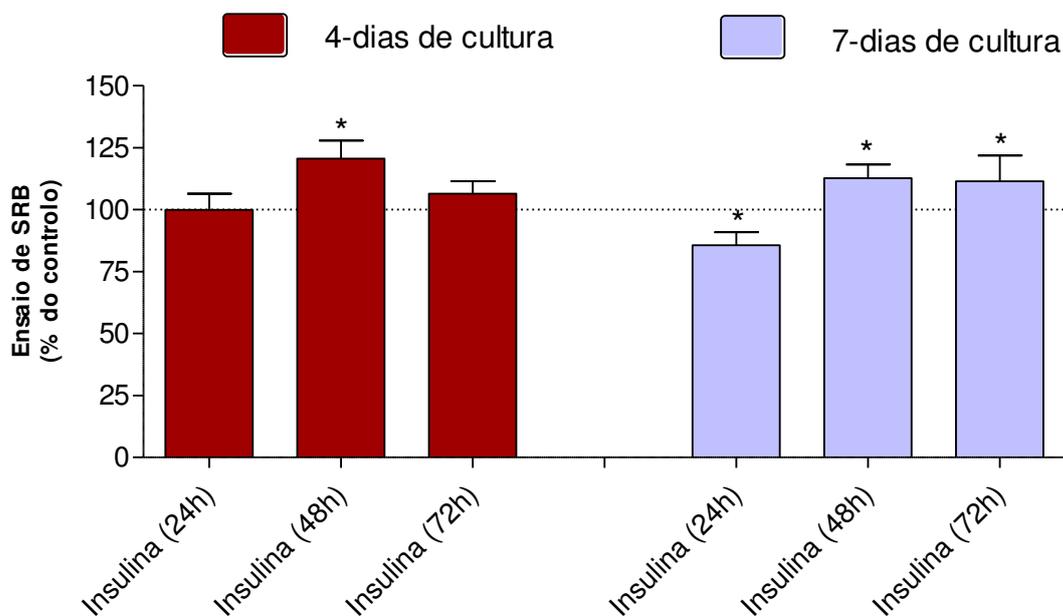


Figura 14 – Efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (24-72h) no crescimento de culturas de células HTR8/SVneo com diferentes tempos de cultura.

O crescimento de cultura foi determinado pelo ensaio de Sulforodamina B (SRB) em culturas com 4 ou 7 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM durante 24, 48 ou 72h (n=12-20). Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM *Significativamente diferente do controlo (p<0,05).

4.3.3. APOPTOSE

Para averiguar o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na taxa de apoptose das células HTR8/SVneo, efetuou-se o ensaio de TUNEL, tendo os resultados obtidos sido analisados por microscopia de fluorescência. Analisando a Figura 15 verifica-se que a exposição crónica à insulina 10 nM durante 48h não evidencia efeitos significativos na taxa de morte celular por apoptose.

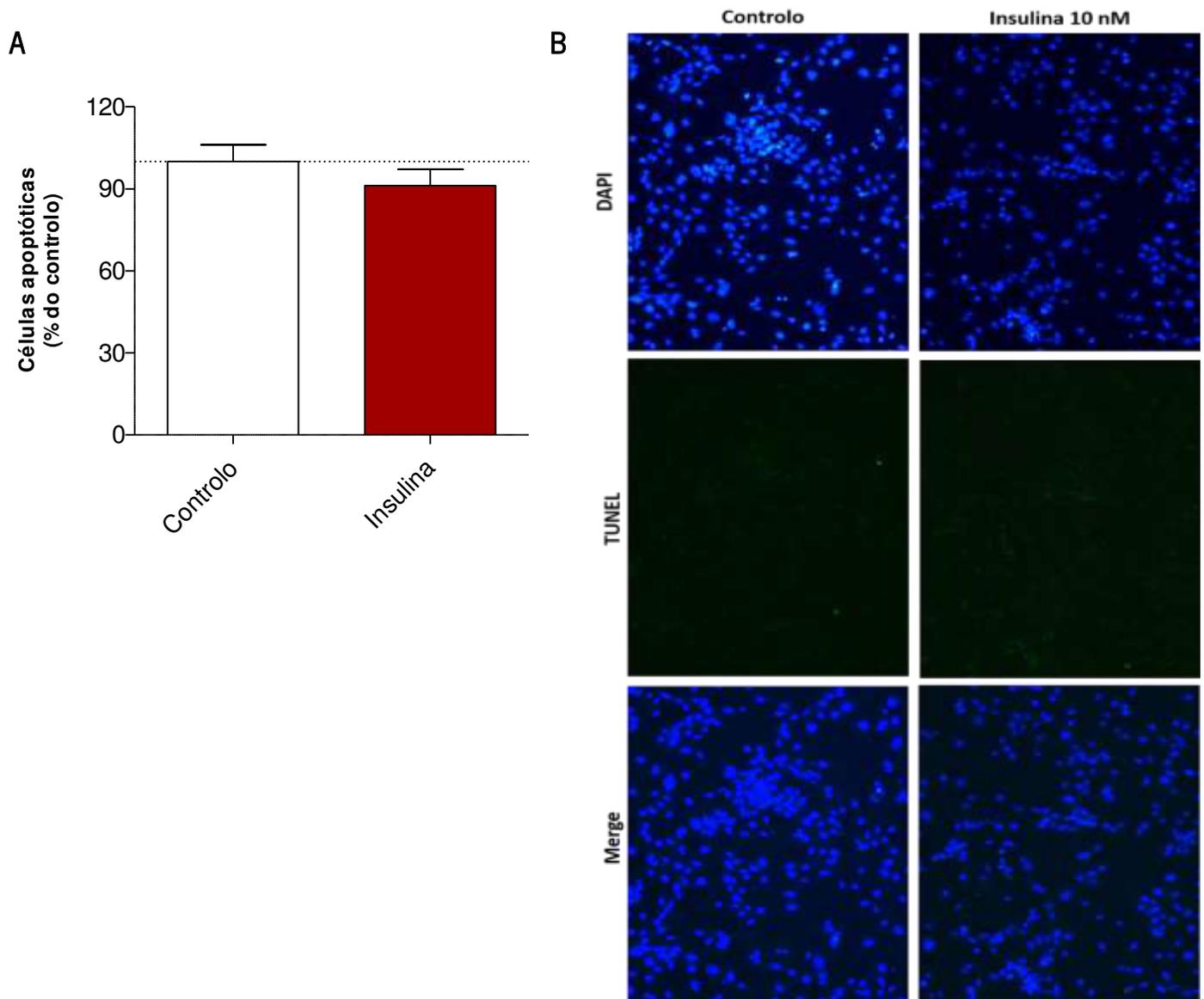


Figura 15 – Efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na taxa de apoptose das células HTR8/SVneo.

(A) A apoptose foi determinada pelo ensaio de TUNEL em culturas com 3 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM durante 48h (n=14). Os resultados são apresentados como médias aritméticas \pm SEM. **(B)** Imagens de fluorescência de células HTR8/SVneo, relativas ao ensaio de TUNEL. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM durante 48h (n=14). O DNA foi corado com DAPI (azul) e os núcleos apoptóticos marcados com *fluorescein isothiocyanate-conjugated dUTP* (verde).

4.3.4. MIGRAÇÃO

Neste estudo foi ainda avaliado o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na migração das células HTR8/SVneo, recorrendo ao método de *injury assay*. Este método avalia a capacidade de migração das células. A análise da migração foi realizada ao fim de 6, 12 e 24h. Como se pode

ver na Figura 16, a insulina 10 nM não teve um efeito significativo na capacidade migratória das células HTR8/SVneo.

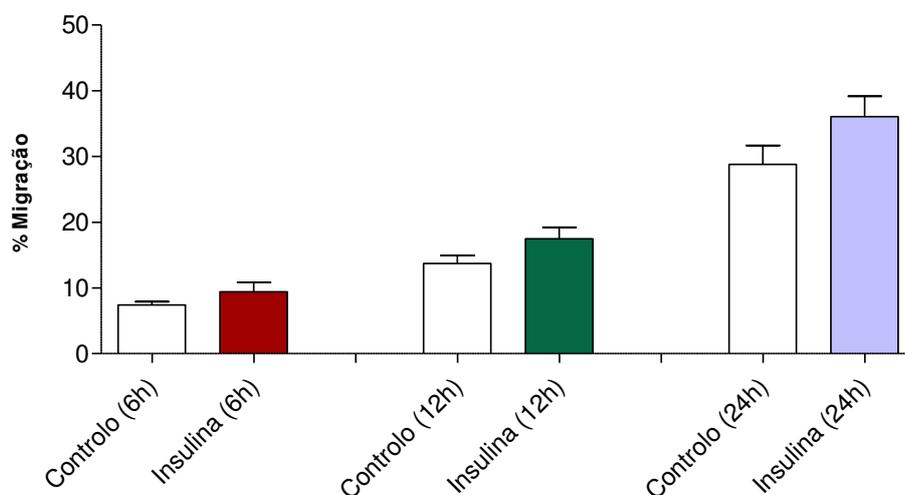


Figura 16 – Efeito da exposição crônica à insulina 10 nM (48h) na migração das células HTR8/SVneo.

A migração foi determinada pelo método de *injury assay* em culturas com 7 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM durante 48h (n=9). Os resultados são apresentados como médias aritméticas \pm SEM.

4.4. INFLUÊNCIA DE INIBIDORES DE VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR SOBRE O EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À INSULINA 10 nM (48h) NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS HTR8/SVneo

Após verificar que a insulina 10 nM (48h) tem a capacidade de induzir um efeito antiproliferativo nas células HTR8/SVneo, investigou-se quais os mecanismos intracelulares envolvidos neste efeito da insulina. Assim, estudou-se a influência de inibidores de vias de sinalização intracelular (PD 98059 - via ERK/MEK; SB 20358 – via da proteína cinase p38 ativada por mitogénios (P38/MAPK); rapamicina – via mTOR; H7 – via das serinas 473/treoninas 308 (Ser473/Thr308); SP 600125 – via c-JNK e LY 294002 – via PI3K) sobre o efeito antiproliferativo da exposição crônica à insulina 10 nM durante 48h, avaliado pela incorporação de ^3H -timidina. Para tal, a linha celular HTR8/SVneo foi incubada na ausência ou presença de insulina, PD 98059 2,5 μM , SB 20358 2,5 μM , rapamicina 100 nM, H7 10 μM , SP 600125 5 μM ou LY 294002 1 μM em meio de cultura sem soro (FBS) durante 48h, e a incorporação de ^3H -timidina avaliada em células com 4 dias de cultura.

Analisando a Figura 17, é possível verificar que a rapamicina só por si aumentou a proliferação em cerca de 38%; pelo contrário, o H7 induziu uma diminuição da proliferação em 36% enquanto o PD 98059, o SB 203580, o SP 600125 e o LY 294002 mostraram-se desprovidos de efeito. É ainda possível observar que o efeito antiproliferativo da insulina foi revertido por exposição simultânea ao inibidor específico da via p38/MAPK (SB 203580), da via mTOR (rapamicina) e da via PI3K (LY 294002), e que os restantes inibidores (PD 98059, H7 ou SP 600125) não foram capazes de impedir o efeito da insulina. Assim, estes resultados indicam que o efeito antiproliferativo da insulina envolve a ativação das vias intracelulares P38/MAPK, mTOR e PI3K, mas não a ativação das vias ERK/MEK, Ser473/Thr308 ou c-JNK.

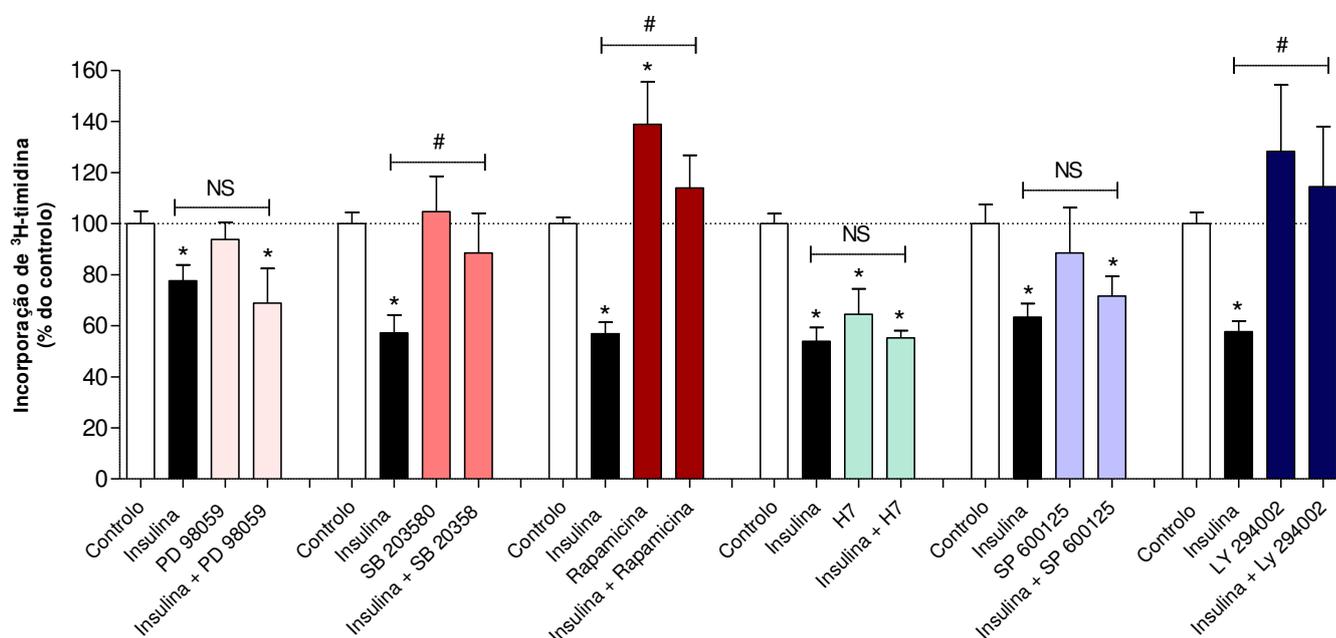


Figura 17 – Influência de inibidores de vias de sinalização intracelular (ERK/MEK, P38/MAPK, mTOR, Ser473/Thr308, c-JNK e PI3K) sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.

A taxa de proliferação foi determinada pela incorporação de ³H-timidina em culturas com 4 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM (n=6-15), PD 98059 2,5 μM (n=8), SB 20358 2,5 μM (n=10-15), rapamicina 100 nM (n=10-15), H7 10 μM (n=6-9), SP 600125 5 μM (n=6-8) e LY 294002 1 μM (n=10-15) durante 48h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM. *Significativamente diferente do controlo (p<0,05); #Significativamente diferente da insulina 10 nM (p<0,05); NS Não significativamente diferente.

4.5. INFLUÊNCIA DE POLIFENÓIS, ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS, ÁCIDO FÓLICO E ESTATINAS SOBRE O EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÓNICA À INSULINA 10 nM (48h) NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS HTR8/SVneo

Por último, neste estudo foi ainda avaliada a capacidade de dois polifenóis (resveratrol e quercetina), dos ácidos gordos polinsaturados EPA e DHA, do ácido fólico e de uma estatina (sinvastatina) em reverterem o efeito antiproliferativo da insulina 10 nM (48h). Assim, a linha celular HTR8/SVneo foi incubada na ausência e presença de insulina 10 nM, resveratrol 2,5 µM, quercetina 1 µM, EPA 50 µM, DHA 50 µM, ácido fólico 1 mM ou sinvastatina 10 µM, durante 48h, e a incorporação de ³H-timidina avaliada em células com 4 dias de cultura.

4.5.1. POLIFENÓIS

Como demonstra a Figura 18, a quercetina (1 µM) causou uma diminuição acentuada (cerca de 18%) na proliferação das células HTR8/svneo, comparativamente ao controlo. Já o resveratrol (2,5 µM) foi desprovido de efeito significativo na proliferação celular. Quando associados com a insulina, verificamos que a quercetina potenciou o efeito da insulina em cerca de 14%, enquanto o resveratrol não mostrou efeito significativo.

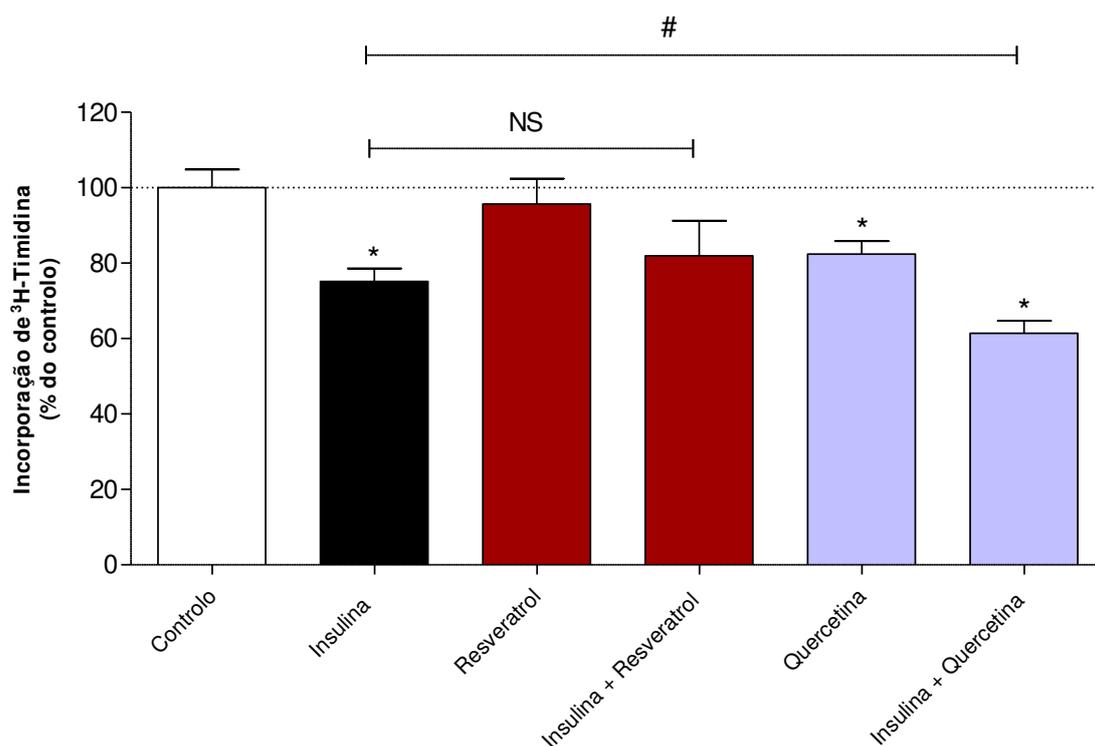


Figura 18 – Influência de polifenóis (resveratrol e quercetina) sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.

A taxa de proliferação foi determinada pela incorporação de ³H-timidina em culturas com 4 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM (n=15), resveratrol 2,5 µM (n=14-15) ou quercetina 1 µM (n=12-15) durante 48h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM * Significativamente diferente do controlo (p<0,05); * Significativamente diferente da insulina 10 nM (p<0,05); NS Não significativamente diferente.

4.5.2. ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS

Posteriormente, fomos investigar a influência dos ácidos gordos polinsaturados EPA (50 µM) e DHA (50 µM) sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM na proliferação das células HTR8/SVneo. Como é visível na Figura 19, ambos os ácidos gordos polinsaturados, EPA e DHA, quando testados só por si, foram capazes de induzir uma redução significativa na proliferação (cerca de 19% e 16% respetivamente). Por sua vez, quando associados com insulina, quer o EPA quer o DHA não foram capazes de reverter o efeito antiproliferativo da insulina.

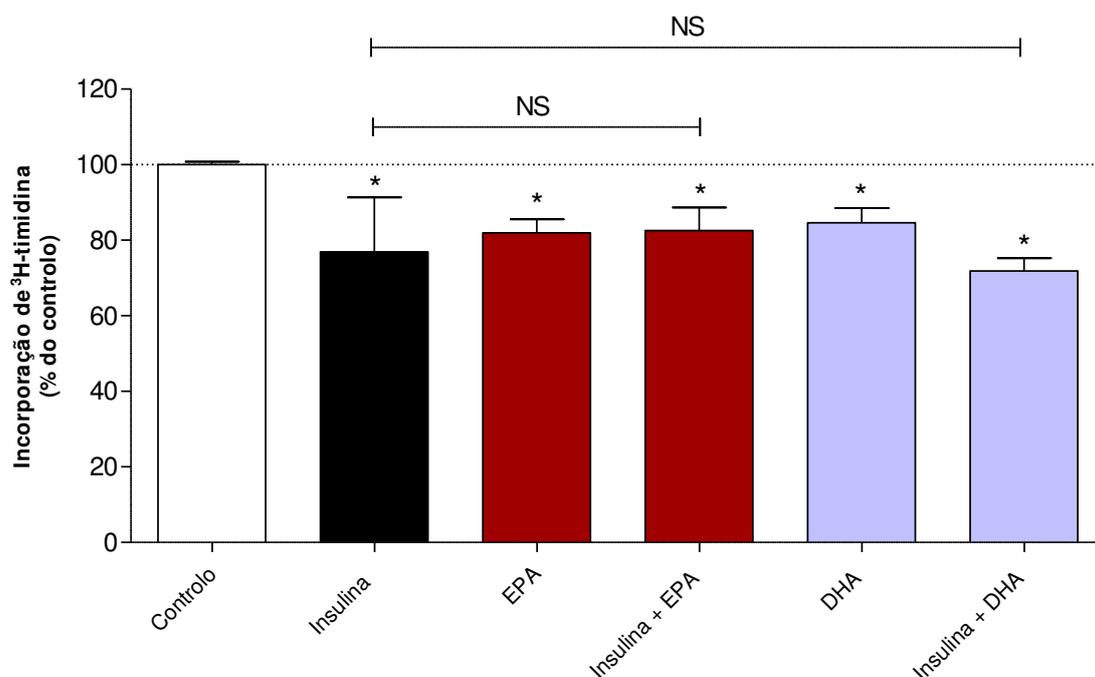


Figura 19 – Influência de ácidos gordos polinsaturados (EPA e DHA) sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.

A taxa de proliferação foi determinada pela incorporação de ³H-timidina em culturas com 4 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM (n=9), ácido eicosapentaenóico (EPA) 50 µM (n=9) ou ácido docosahexaenóico (DHA) 50 µM (n=9) durante 48h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM *Significativamente diferente do controlo (p<0,05); ^{NS}Não significativamente diferente.

4.5.3. ÁCIDO FÓLICO

Seguidamente, estudou-se a influência do ácido fólico 1 mM sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM na proliferação das células HTR8/SVneo. Observando a Figura 20, é possível verificar que o ácido fólico 1 mM só por si não alterou significativamente a proliferação das células HTR8/SVneo. Por sua vez, quando avaliamos a associação da insulina com o ácido fólico verificou-se que o ácido fólico não foi capaz de reverter significativamente o efeito da insulina na proliferação celular.

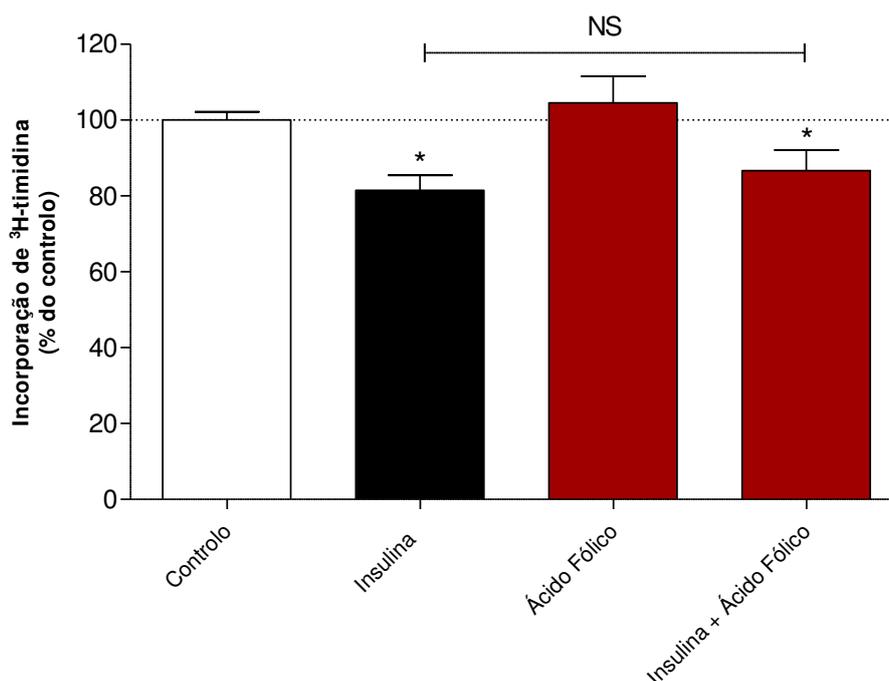


Figura 20 – Influência do ácido fólico sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.

A taxa de proliferação foi determinada pela incorporação de ³H-timidina em culturas com 4 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM (n=9) ou ácido fólico 1 mM (n=9) durante 48h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM *Significativamente diferente do controlo (p<0,05). NS=Não significativamente diferente.

4.5.4. SINVASTATINA

Por último, estudou-se a influência da sinvastatina 10 µM sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM na proliferação das células HTR8/SVneo. Como mostra a Figura 21, a sinvastatina só por si, não foi capaz de alterar significativamente a proliferação das células HTR8/SVneo. Adicionalmente, a associação da sinvastatina com insulina não só não foi capaz de reverter o efeito da insulina, como potenciou o seu efeito.

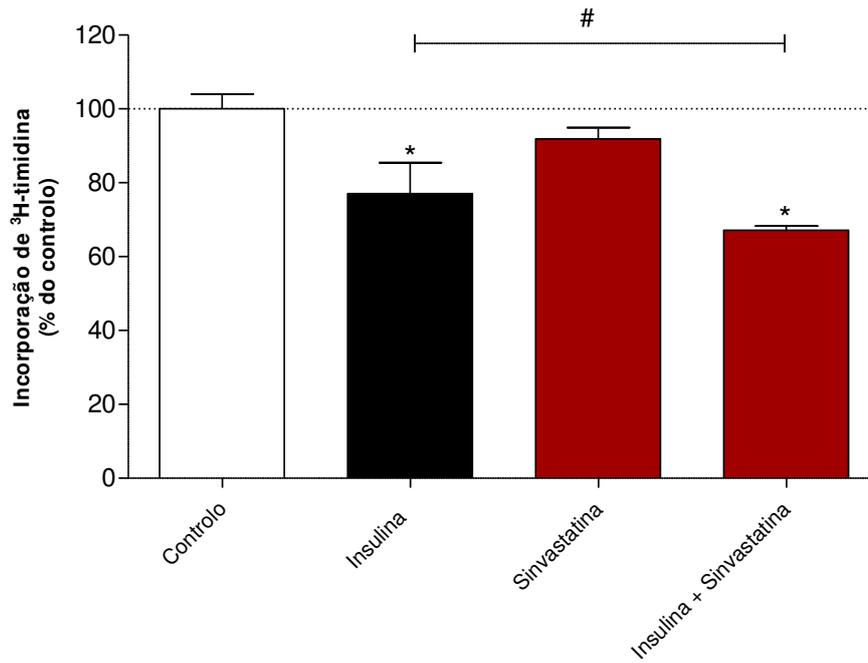


Figura 21 – Influência da simvastatina sobre o efeito da exposição crónica à insulina 10 nM (48h) na proliferação das células HTR8/SVneo.

A taxa de proliferação foi determinada pela incorporação de ³H-timidina em culturas com 4 dias, como descrito previamente nos Métodos. As células foram previamente incubadas a 37°C na ausência ou presença de insulina 10 nM (n=6) ou simvastatina 10 μM (n=6) durante 48h. Os resultados são apresentados como médias aritméticas ± SEM *Significativamente diferente do controlo (p<0,05); #Significativamente diferente da insulina 10 nM (p<0,05).

Capítulo V – Discussão

5. DISCUSSÃO

A placenta desempenha um papel fundamental durante a gravidez, sendo responsável pela troca de oxigênio, nutrientes e produtos residuais entre a circulação fetal e materna (Schulz and Widmaier 2004). É ainda um importante órgão endócrino que liberta durante a gravidez um largo espectro de hormonas e fatores de crescimento, conferindo proteção imunológica ao feto (Perez-Perez, Maymo et al. 2013). A formação da placenta – placentação – é um processo contínuo e altamente regulado, que se inicia após a fertilização e termina no momento do parto (James, Carter et al. 2012). Uma placentação adequada e um aporte adequado de nutrientes ao feto é crucial para o desenvolvimento e crescimento do feto e para o sucesso da gravidez (Gude, Roberts et al. 2004; van Dijk and Oudejans 2014). Alterações neste processo têm sido associadas a patologias da gravidez tais como a pré-eclâmpsia, restrição do crescimento fetal e até mesmo aborto espontâneo (Hills, Elder et al. 2004; Vambergue and Fajardy 2011; Mayama, Izawa et al. 2013).

A diabetes é a doença metabólica mais prevalente nas grávidas e está associada a diversas complicações maternas e fetais, tais como macrossomia, morte fetal e parto prematuro (Yessoufou and Moutairou 2011). A DM tipo 2 e a DMG são os dois tipos mais frequentes de diabetes na gravidez, e incluem características como a hiperglicemia, hiperinsulinemia (Ben-Haroush, Yogev et al. 2004), hiperleptinemia e uma inflamação de baixo grau provocada pela libertação de citocinas como o TNF- α (Fernandez-Morera, Rodriguez-Rodero et al. 2010). Pouco se sabe sobre a influência da diabetes na placentação. Por esse motivo, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações que a insulina, leptina, TNF- α e glicose (principais marcadores associados a diabetes na gravidez) induzem no processo de placentação, utilizando uma linha celular de trofoblastos extravilositários de primeiro trimestre (células HTR8/SVneo).

A presença de recetores de insulina (Mandl, Haas et al. 2002), leptina (Cauzac, Czuba et al. 2003) e TNF- α (Sanchez, Zhang et al. 2000) e transportadores de glicose (Bifulco, Di Carlo et al. 2002) em trofoblastos placentários indica que a insulina, leptina, glucose e TNF- α podem induzir efeitos biológicos na placenta, assim como apresentar uma ação moduladora sobre a função celular (Sanchez, Zhang et al. 2000). Isto sugere portanto que este conjunto de biomarcadores de diabetes na gravidez pode influenciar a proliferação e sobrevivência das células trofoblásticas (Perez-Perez, Maymo et al. 2013).

A linha celular HTR-8/SVneo foi obtida de placentas humanas de primeiro trimestre e imortalizada por transfeção com um plasmídeo que contém o antígeno T de um vírus símio 40 (sv40), e um antígeno T grande de símio (TAG). Esta linha celular retém o fenótipo epitelial e proliferativo e características invasivas dos EVT, sendo assim um sistema aceite como modelo *in vitro* para o estudo das características dos EVT (Graham, Hawley et al. 1993). Apesar de ser difícil estabelecer um modelo de cultura primária de EVT, os EVT *in vitro* podem desenvolver características de um fenótipo celular trofoblástico mais geral, podendo proporcionar, uma indicação dos processos que ocorrem na placenta *in vivo* (Yui, Garcia-Lloret et al. 1994).

Neste estudo, começamos inicialmente por testar o efeito da exposição crónica a diferentes concentrações de insulina, leptina, TNF- α e glicose em parâmetros como a proliferação (por quantificação da incorporação de ^3H -timidina) e a viabilidade celular (pelo ensaio de MTT e LDH) durante 24h.

A insulina é uma hormona anabólica com uma ampla gama de efeitos *in vivo*. Para além dos seus efeitos sobre o metabolismo, sabe-se que a insulina é capaz de estimular o crescimento e proliferação de muitos tipos de células (Straus 1981). No presente estudo, demonstrou-se que a exposição durante 24h à insulina (1 nM e 10 nM) originou uma diminuição dependente da concentração na proliferação das células HTR8/SVneo, e verificou-se ainda que a exposição crónica à insulina (10 nM) durante 48h causou uma redução na proliferação mais marcada que às 24h, e curiosamente um aumento da proliferação às 72h. Tendo em conta estes resultados, pode-se concluir que a insulina parece atuar como um inibidor potente da proliferação nas células HTR8/SVneo. O aumento da proliferação às 72h pode ser justificado pelo facto de que a longo prazo ocorra ativação de via(s) de sinalização que revertam a inibição da proliferação causada pelo ambiente hiperinsulinémico, que parece envolver as vias PI3K, mTOR e p38/MAPK (ver abaixo). Contudo, num outro estudo, a exposição à insulina (0,1 nM e 1 nM) por 48h estimulou a proliferação de células JAR e, em menor grau, das células JEG-3 e que, em contraste, a linha celular BeWo não foi afetada (Mandl, Haas et al. 2002). As linhas celulares JAR, JEG-3 e Bewo são linhas de trofoblastos de 3º trimestre. Portanto, pode especular-se que a insulina atua de forma diferente na regulação da proliferação em trofoblastos de 1º trimestre (HTR8/SVneo) e em trofoblastos de 3º trimestre (Mandl, Haas et al. 2002).

Os elevados níveis de TNF- α apresentados durante repostas inflamatórias estão associados a vários processos patológicos e até ao desencadeamento de funções trofoblásticas anormais (Knofler, Mosl et al. 2000; Staun-Ram and Shalev 2005). No presente trabalho, verificou-se que a

exposição ao TNF- α (10 ng/l ou 100 ng/l) durante 24h causou uma redução pequena mas significativa na proliferação. Como tal, estudou-se o efeito do TNF- α (100 ng/l) na proliferação das células HTR8/SVneo após exposições mais prolongadas (48h e 72h). No entanto, verificou-se que apenas a exposição ao TNF- α por 24h induziu uma diminuição significativa da proliferação das células HTR8/SVneo. Este resultado sugere que esta citocina pode atuar como um inibidor do crescimento a curto prazo, e que a longo prazo as células HTR/SVneo se tornem resistentes à ação do TNF- α (Knofler, Mosl et al. 2000). Em comparação com trabalhos publicados em outros tipos celulares, os resultados obtidos mostraram-se maioritariamente concordantes. De facto, vários estudos demonstraram que a incubação com o TNF- α por 24h reduziu a proliferação celular na linha celular TCL (linha celular trofoblástica imortalizada; incubada com TNF- α 1 ng/l, 10 ng/l ou 100 ng/l) (Seki, Matuoka et al. 2007) e em células ED27 (linha celular imortalizada a partir de vilosidades coriônicas de primeiro trimestre, semelhantes às células trofoblásticas; incubada com TNF- α 3 ng/l, 30 ng/l ou 300 ng/l) (Knofler, Mosl et al. 2000). No entanto, o TNF- α pode exercer diversos efeitos sobre as células trofoblásticas, dependendo do nível de citocina, da presença de outras citocinas ativas e de fatores de crescimento (Knofler, Mosl et al. 2000).

Vários estudos têm mostrado que para além da leptina regular o crescimento e desenvolvimento fetal (Henson and Castracane 2006) também induz a proliferação de células trofoblásticas (Cameo, Bischof et al. 2003; Magarinos, Sanchez-Margalet et al. 2007). Demostramos pelo ensaio de incorporação de ^3H -timidina, que durante 24h a leptina (25 ng/l ou 100 ng/l) não influencia de forma significativa a proliferação das células HTR8/SVneo, embora a leptina (100 ng/l) possua uma tendência para induzir um aumento na proliferação. Os nossos resultados mostram-se concordantes com um estudo anterior que demonstrou que a incubação a curto prazo com concentrações na ordem dos 100 ng/l leptina não induziu efeito significativo na proliferação de células JEG-3 (Magarinos, Sanchez-Margalet et al. 2007) Em contraste, em células Bewo, 50 ng/l leptina parece ser suficiente para induzir um aumento na proliferação (Magarinos, Sanchez-Margalet et al. 2007). Pensa-se no entanto, que as vias envolvidas na ação da leptina sobre a proliferação, as vias MAPK e PI3K, possam ser diferentes dependendo do tipo de linha celular (Perez-Perez, Maymo et al. 2008).

Sabe-se que a glicose controla uma variedade de funções celulares e que alterações nas concentrações extracelulares de glucose podem determinar um aumento da proliferação celular ou a morte celular (Bifulco, Di Carlo et al. 2002). Tal como a leptina, também a exposição crónica

à glicose (20 mM; 24h) mostrou-se desprovida de efeito na proliferação das células HTR8/SVneo avaliada pelo ensaio de incorporação de ^3H -timidina, embora possua uma certa tendência para aumentar a proliferação neste tipo de células. Apesar de se encontrar descrito que a hiperglicemia pode induzir uma redução da proliferação dos trofoblastos levando a um atraso no crescimento e desenvolvimento da placenta, especialmente nas primeiras semanas de gestação (Vambergue and Fajardy 2011), num estudo recente, realizado com a linha celular BeWo, verificou-se que uma elevada concentração de glicose (25 mM) induziu um aumento na proliferação (Chen, Wu et al. 2014). Estes resultados variáveis podem ser justificados pelas concentrações de glicose usadas em cada estudo, pois os efeitos da glicose sobre o desenvolvimento da placenta e a invasão e proliferação do trofoblasto ainda não são completamente compreendidos (Belkacemi, Lash et al. 2005).

Relativamente aos estudos de viabilidade celular pelos ensaios de MTT e LDH, nenhum composto, a exceção do $\text{TNF-}\alpha$ 100 ng/l, alterou significativamente a viabilidade da linha celular HTR8/Svneo pelo ensaio de MTT. Em concordância com estes resultados, a viabilidade celular avaliada através da atividade extracelular da LDH mostrou uma ausência de efeito significativo para todos os compostos testados. De um modo semelhante ao verificado no nosso estudo, um estudo com células JAR, BeWo e JEG-3 mostrou que a insulina (0,1 nM e 1 mM), durante 48h não teve influência sobre a viabilidade em nenhum dos três tipos de células (Mandl, Haas et al. 2002). Relativamente ao $\text{TNF-}\alpha$, estudos realizados por Stubert et al (2014) mostraram que quer pelo ensaio de LDH quer pelo ensaio de MTT o $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/l e 100 ng/l; 24h) aumenta a viabilidade das células BeWo (Stubert, Waldmann et al. 2014). No que diz respeito à glicose, Masumoto et al (2011) reportaram que altas concentrações de glicose (42 mM/l) diminuem significativamente a viabilidade celular em células BeWo (Masumoto, Takamoto et al. 2011).

No seu conjunto, estes resultados sugerem que apenas a insulina e o $\text{TNF-}\alpha$ interferem significativamente com a proliferação na linha celular HTR8/SVneo. Relativamente a viabilidade, apenas o $\text{TNF-}\alpha$ interferiu com este parâmetro. Contudo, em outros tipos de células trofoblásticas é provável que a insulina, leptina, $\text{TNF-}\alpha$ e glicose possam exercer outros efeitos *in vitro*, uma vez que, o grau de transformação da linha de células trofoblásticas, o tipo de células, a concentração dos compostos e até as várias vias envolvidas na sinalização destes compostos são diferentes. Seguidamente propusemo-nos estudar mais profundamente o efeito da insulina na proliferação celular, avaliando o efeito crónico da insulina 10 nM (24h, 48h e 72h) na proliferação celular e no

crescimento da cultura, em células com 4 e com 7 dias de cultura. Verificou-se que a insulina provocou uma diminuição bastante marcada na proliferação celular às 48h, tanto em células com 4 como em células com 7 dias de cultura. Curiosamente, foi observado um aumento no crescimento de cultura (avaliado pela determinação do conteúdo proteico total pelo método SRB) após uma exposição de 48h à insulina, tanto em células com 4 como em células com 7 dias de cultura. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem a insulina provoca hiperplasia das células HTR8/SVneo, uma vez que diminui a síntese de ADN durante a mitose (determinado pelo ensaio de ³H-timidina) e ao mesmo tempo aumenta o conteúdo proteico na cultura (determinado pelo ensaio de SRB).

Para além disso, avaliou-se o efeito da insulina 10 nM (48h) na apoptose e na migração celular. Apesar de em vários tipos de células a insulina atuar como um fator de sobrevivência e inibir a morte celular (Mandl, Haas et al. 2002), mostrou-se que a exposição crónica à insulina não induziu um efeito significativo sobre o índice de apoptose das células HTR8/SVneo. Assim, descartamos a possibilidade de o efeito antiproliferativo da insulina ser devido ao facto de algumas células sofrerem apoptose. No que diz respeito à capacidade de migração das células HTR8/SVneo, verificou-se que a insulina também não teve qualquer efeito significativo. Este resultado pode dever-se ao facto de que as várias vias de sinalização da insulina não se encontram diretamente envolvidas na regulação da migração celular. Em resumo, a insulina não parece regular significativamente a apoptose e a migração das células HTR8/SVneo.

Na experiências seguintes verificou-se quais as vias intracelulares envolvidas no efeito antiproliferativo da insulina, recorrendo a inibidores específicos de diferentes vias de sinalização. Estímulos como fatores de crescimento, hormonas e citocinas conduzem à ativação de cascatas de sinalização tais como MAPKs, PI3K, mTOR, c-JNK e ERK/MERK, que controlam uma vasta gama de processos biológicos incluindo a proliferação, diferenciação, migração e apoptose. Assim, não é surpreendente que essas diferentes vias de sinalização também desempenhem um papel crítico no desenvolvimento da placenta (Knofler 2010; Wagener, Yang et al. 2013) e assim na proliferação celular. A insulina desempenha uma importante função na regulação e modulação de processos metabólicos e não metabólicos (nucleares) que envolvem a ativação de diferentes mecanismos de sinalização. Apesar de os mecanismos de sinalização permanecerem não totalmente conhecidos, são conhecidas duas vias principais, as vias PI3K e MAPK (Pessin and Saltiel 2000; Buchanan, Xiang et al. 2007; Metzger, Buchanan et al. 2007). A insulina exerce também efeitos metabólicos na placenta (Hiden, Glitzner et al. 2009).

Por análise dos nossos resultados, verificou-se que o efeito antiproliferativo da insulina foi revertido por exposição simultânea (48h) ao inibidor específico da via mTOR (rapamicina), da via PI3K (LY 294002) ou da via P38/MAPK (SB 203580). Os nossos resultados sugerem assim, que o efeito antiproliferativo de insulina envolve a ativação de vias intracelulares mTOR, P38/MAPK e PI3K. Curiosamente, as vias PI3K e mTOR são vias essenciais na sinalização da insulina (Cusi, Maezono et al. 2000; Colomiere, Permezel et al. 2009; Ye, Varamini et al. 2012; Blagosklonny 2013). Adicionalmente, estes resultados confirmam que as vias PI3K e mTOR parecem ser componentes chave no crescimento e proliferação de células trofoblásticas, tal como proposto anteriormente (Murakami, Ichisaka et al. 2004; Wen, Abbasi et al. 2005). Relativamente à via p38/MAPK, também existem numerosas evidências que indicam o envolvimento desta via em várias funções fisiológicas, incluindo o controlo do ciclo celular e da proliferação celular em vários tipos de células (Ambrosino and Nebreda 2001), incluindo células da placenta (Forbes and Westwood 2010).

Por último, testou-se a capacidade de polifenóis (resveratrol e quercetina), ácidos gordos polinsaturados (EPA e DHA), ácido fólico e estatinas (sinvastatina) em reverter o efeito antiproliferativo da insulina. Sabe-se que compostos como polifenóis (Singh, Kumar et al. 2013), ácidos gordos polinsaturados (Klingler, Blaschitz et al. 2006), ácido fólico (Antony 2007) e estatinas (Forbes, Shah et al. 2015) podem influenciar processos cruciais para o desenvolvimento normal do embrião e da placenta, tais como a proliferação celular. Estes compostos, só por si ou em combinação com a insulina, podem ser de interesse terapêutico durante a gravidez associada ou não a diabetes (Duttaroy 2009; Singh, Kumar et al. 2013; Forbes, Shah et al. 2015).

No que diz respeito aos polifenóis, por análise dos nossos resultados pode-se concluir que a quercetina (1 μ M) foi capaz de induzir uma diminuição significativa da proliferação, quando comparada com o controlo. Quando se associaram os polifenóis com a insulina, a quercetina não reverteu o efeito antiproliferativo da insulina, mas sim potenciou o seu efeito, reduzindo ainda mais a proliferação das células HTR8/SVneo. Estes resultados sugerem que a exposição crónica de grávidas diabéticas em condições de hiperinsulinemia ao polifenol quercetina em quantidades elevadas, obtidas por suplementação, pode eventualmente potenciar o efeito antiproliferativo da insulina, provocando uma redução mais acentuada da proliferação de células trofoblásticas e causando efeitos adversos. Estudos anteriores demonstraram que a quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavenona), um flavonoide encontrado em alimentos como a cebola, a maçã, os brócolos e as bagas e em bebidas como o chá e o vinho tinto (Araujo, Goncalves et al. 2011), é

capaz de inibir a fosforilação do recetor da insulina na presença de insulina, resultando numa redução da proliferação celular (Nomura, Takahashi et al. 2008). Também foi demonstrado que a quercetina é capaz de inibir o crescimento e a proliferação em várias linhas celulares (Araujo, Goncalves et al. 2011). Existem estudos que indicam que este efeito antiproliferativo da quercetina *in vitro* pode estar associado a mecanismos como a paragem do ciclo celular nas fases G₀/G₁, G₂/M e S e a inibição da proliferação mediada pelas vias de sinalização intracelulares MAPK, PI3K, proteína cinase C (PKC) e proteína tirosina cinase (PTK) (Araujo, Goncalves et al. 2011).

O polifenol resveratrol (*trans*-3,5,40-trihidroxiestilbeno) existe em vários tipos de fruta, sendo mais abundante em uvas vermelhas e mirtilos (Singh, Kumar et al. 2013), e já mostrou ser um potencial agente protetor contra o cancro, lesões inflamatórias, diabetes *mellitus* e doença cardiovascular (Baur and Sinclair 2006). No que diz respeito à diabetes, o resveratrol tem mostrado resultados promissores. Em ratinhos obesos e diabéticos induzidos pela dieta, o resveratrol corrigiu a hiperglicemia e diminuiu a hiperinsulinemia (Ramadori, Gautron et al. 2009). Num outro estudo, o resveratrol demonstrou atividade anti-hiperglicémica, com melhoria significativa nos níveis de insulina (Sharma, Misra et al. 2011). Ensaio clínico sugerem que o resveratrol é seguro e tem um enorme potencial no tratamento da obesidade e resistência à insulina em humanos (Singh, Kumar et al. 2013). Contudo, é preciso ter em conta que dependendo do tipo de células utilizadas o resveratrol pode inibir ou potenciar a proliferação celular (Araujo, Goncalves et al. 2011). A inibição da proliferação por parte do resveratrol pode ser explicada por este limitar o ciclo celular nas fases S, G₁/S, G₂/M ou menos frequentemente na fase S/G₂ (Araujo, Goncalves et al. 2011) e pela sua capacidade para interferir com o fator nuclear-kB (NF-kB) e com as vias intracelulares p38/MAPK e PI3K (Fulda and Debatin 2006; Wong, Villanueva et al. 2010; Araujo, Goncalves et al. 2011; Singh, Kumar et al. 2013)

Dado que os LC-PUFAS exibem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e têm sido sugeridos como agentes terapêuticos em patologias placentárias (Jones, Mark et al. 2014), decidiu-se estudar o efeito dos LC-PUFAs (EPA e DHA) na proliferação das células HTR8/SVneo. Os nossos resultados revelaram que a exposição crónica aos LC-PUFAs EPA (50 µM) e DHA (50 µM) só por si reduziu significativamente a proliferação das células HTR8/SVneo. No entanto, quando associados à insulina, nenhum dos dois LC-PUFAs foi capaz de reverter o efeito antiproliferativo da insulina. O efeito da suplementação com n-3 LC-PUFAs na proliferação em células da placenta foi descrito previamente de uma forma detalhada por Klingler et al (2006), que

reportou que a suplementação com DHA não teve nenhum efeito sobre a proliferação placentária (Klingler, Blaschitz et al. 2006). Porém, estudos realizados *in vitro* sobre o efeito proliferativo específico de EPA e DHA têm mostrado algumas inconsistências. Estudos noutros tipos celulares, como células U937-1 (linha celular monocítica) e células 3924A (linha celular de hepatocarcinoma maligno) sugerem que o EPA reduz a proliferação celular de forma dependente da concentração (Calviello, Palozza et al. 1998; Finstad, Drevon et al. 1998) enquanto o DHA não afeta a proliferação celular (Calviello, Palozza et al. 1998). Em diversos estudos, os efeitos biológicos dos PUFAs têm sido atribuídos à sua incorporação nos fosfolípidos das membranas celulares, onde eles podem afetar a síntese de eicosanóides, a peroxidação lipídica, alterar a fluidez da membrana e afetar a sinalização celular (Finstad, Drevon et al. 1998).

Durante a gravidez, a placenta concentra ácido fólico para a circulação fetal. Este nutriente é criticamente importante para a síntese de ADN, proliferação celular (Hutson, Stade et al. 2012) e proteção antioxidante (Williams, Bulmer et al. 2011). De facto, a deficiência materna em ácido fólico tem sido associada ao aborto espontâneo, descolamento prematuro da placenta e restrição de crescimento (Williams, Bulmer et al. 2011). Por outro lado, a suplementação com ácido fólico durante o período inicial da gravidez pode reduzir a incidência de defeitos no tubo neural (Klingler, Blaschitz et al. 2006). Neste estudo, mostramos que a exposição crónica ao ácido fólico só por si ou em combinação com insulina foi desprovida de efeito significativo na proliferação das células HTR8/SVneo. Estes resultados estão em linha com um estudo realizado por Klinger et al. (2006), em que verificaram que a suplementação com 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), uma forma metabólica ativa do folato, não apresentou efeito sobre a proliferação de células da placenta humana (Klingler, Blaschitz et al. 2006). Já um outro estudo mostrou que a o ácido fólico atua de forma bifásica em EVT, dependendo da concentração utilizada (Williams, Bulmer et al. 2011).

As estatinas podem influenciar a síntese das membranas, a replicação do ADN, a proliferação celular, crescimento, metabolismo e a glicosilação de proteínas cruciais para o desenvolvimento normal do embrião e da placenta (Kenis, Tartakover-Matalon et al. 2005). Mostrou-se que a exposição crónica à sinvastatina (10 μ M) foi desprovida de efeito significativo na proliferação das células HTR8/SVneo. No entanto, quando associada à insulina, a sinvastatina não só não reverteu o efeito da insulina na proliferação das células HTR8/SVneo, como potenciou o seu efeito. Em células trofoblásticas, Kenis et al. (2005) observaram que a sinvastatina originou uma diminuição da proliferação celular (Kenis, Tartakover-Matalon et al. 2005). A alteração da proliferação por

parte das estatinas pode ser devida a vários mecanismos de ação previamente descritos: por inibição da enzima HMG-CoA redutase, a enzima limitante na formação do colesterol ou por provocarem uma redução na concentração de mavelonato e de derivados de isoprenóides (Bellosta, Ferri et al. 2000; Kenis, Tartakover-Matalon et al. 2005). De facto, os isoprenos estão envolvidos na iniciação da síntese de ADN e, portanto, também regulam o crescimento das células (Kenis, Tartakover-Matalon et al. 2005). Além disso, as estatinas podem levar à interrupção e desregulação das vias de sinalização intracelular (Nordstrand, Lundholm et al. 2013) e vias de sinalização como MAPKs, PI3K, mTOR, c-JNK e ERK/MERK controlam uma vasta gama de processos biológicos incluindo a proliferação, diferenciação, migração e apoptose (Knofler 2010; Wagener, Yang et al. 2013). A associação de sinvastatina com insulina deverá ser desaconselhada durante a gravidez diabética, uma vez que poderá induzir alterações no processo de placentação e levar ao desenvolvimento de várias complicações quer para a mãe quer para o feto.

Capítulo VI – Conclusão e Perspetivas Futuras

6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Com este trabalho foi possível avaliar o efeito de vários marcadores associados à diabetes na gravidez (insulina, leptina, TNF- α e glicose) na placentação em células trofoblásticas de primeiro trimestre (células HTR8/SVneo).

Tomando em conjunto estes resultados, é possível concluir que: a) dos biomarcadores testados, apenas o tratamento crónico com 10 nM de insulina foi capaz de reduzir significativamente a proliferação das células HTR8/SVneo; b) para além de um efeito antiproliferativo, a insulina provoca hiperplasia das células HTR8/SVneo, uma vez que diminui o índice de mitose celular (avaliada com o ensaio de ^3H -timidina), aumentando simultaneamente o teor de proteínas da cultura (avaliada com o ensaio SRB); c) o efeito antiproliferativo da insulina envolve a ativação das vias de sinalização PI3K, mTOR e p38/MAPK, e d) nenhum dos compostos testados (os polifenóis resveratrol e quercetina, os ácidos gordos polinsaturados EPA e DHA, o ácido fólico e a estatina sinvastatina) foram capazes de reverter o efeito antiproliferativo da insulina. Curiosamente, a quercetina e a sinvastatina potenciaram o efeito antiproliferativo da insulina.

O nosso estudo é o primeiro a sugerir que a insulina tem um efeito antiproliferativo em trofoblastos extravilositários de primeiro trimestre, propondo que uma gravidez exposta a condições de hiperinsulinemia, que é característica da DM tipo 2 e da DMG, pode levar a uma redução na proliferação de EVT, que poderá resultar numa alteração do processo de placentação e no desenvolvimento de várias complicações durante a gravidez, prejudiciais quer para a mãe quer para o feto. Os nossos resultados sugerem ainda que em condições de hiperinsulinemia, a suplementação com polifenóis como a quercetina ou estatinas como a sinvastatina pode ainda agravar esses efeitos adversos.

Uma vez que atualmente pouco se sabe sobre as consequências da diabetes na gravidez no processo de placentação, os resultados deste projeto são um passo importante para compreender o impacto que os vários biomarcadores de diabetes na gravidez, e mais especificamente a insulina, podem ter nesse processo.

Os resultados obtidos lançam algumas expectativas e abrem novas vias de investigação a explorar. Assim futuramente, seria interessante perceber os mecanismos moleculares subjacentes ao efeito da insulina na proliferação celular, de forma a perceber em que fases do ciclo celular a insulina atua. Seria também importante alargar o presente trabalho à realização de estudos *in vivo* de forma a validar os resultados conseguidos *in vitro*.

Assim, seria de interesse avaliar a placentação *in vivo* através do uso de ratos Goto-Kakizaki (modelo animal com DM tipo 2) (Cefalu 2006) ou então sujeitar ratos Wistar (modelo não diabético usado para o estudo da diabetes) (King 2012) a condições de hiperinsulinemia, de forma a perceber se a insulina causa tal como *in vitro*, redução da proliferação das células EVT. Se tal acontecer, para tentar reverter o efeito antiproliferativo da insulina, para além de testar compostos como polifenóis, ácidos gordos polinsaturados, ácido fólico ou estatinas, pode-se ainda testar em conjunto ácido fólico + DHA e ácido fólico + resveratrol em EVT tratados com insulina, uma vez que outros estudos têm mostrado resultados promissores nesse sentido (Klingler, Blaschitz et al. 2006; Singh, Kumar et al. 2013). Poderia ser de interesse verificar ainda se a associação da insulina com quercetina ou sinvastatina potencia tal como *in vitro* a redução da proliferação dos EVT. Se tal acontecer, seria importante perceber as consequências que a redução da proliferação causa quer no processo de placentação, quer no feto.

Capítulo VII – Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrosino, C. and A. R. Nebreda (2001). "Cell cycle regulation by p38 MAP kinases." *Biol Cell* 93(1-2): 47-51.
- Antony, A. C. (2007). "In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development." *Am J Clin Nutr* 85(2): 598-603.
- Araujo, J. R., A. Correia-Branco, et al. (2013). "Oxidative stress decreases uptake of neutral amino acids in a human placental cell line (BeWo cells)." *Reprod Toxicol* 40(2): 76-81.
- Araujo, J. R., A. Correia-Branco, et al. (2013). "L-methionine placental uptake: characterization and modulation in gestational diabetes mellitus." *Reprod Sci* 20(12): 1492-1507.
- Araujo, J. R., P. Goncalves, et al. (2011). "Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines." *Nutr Res* 31(2): 77-87.
- Araujo, J. R., A. C. Pereira, et al. (2013). "Oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide interferes with the placental transport of glucose: In vitro studies with BeWo cells." *Eur J Pharmacol* 720(1): 218-226.
- Barua, S., S. Kuizon, et al. (2014). "Folic acid supplementation in pregnancy and implications in health and disease." *J Biomed Sci* 21(1): 77-84.
- Basak, S., M. K. Das, et al. (2013). "Fatty acid-induced angiogenesis in first trimester placental trophoblast cells: possible roles of cellular fatty acid-binding proteins." *Life Sci* 93(21): 755-762.
- Basak, S. and A. K. Duttaroy (2013). "Effects of fatty acids on angiogenic activity in the placental extravillous trophoblast cells." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88(2): 155-162.
- Baur, J. A. and D. A. Sinclair (2006). "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." *Nat Rev Drug Discov* 5(6): 493-506.
- Belkacemi, L., G. E. Lash, et al. (2005). "Inhibition of human trophoblast invasiveness by high glucose concentrations." *J Clin Endocrinol Metab* 90(8): 4846-4851.
- Bellosta, S., N. Ferri, et al. (2000). "Non-lipid-related effects of statins." *Ann Med* 32(3): 164-176.
- Ben-Haroush, A., Y. Yogev, et al. (2004). "Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes." *Diabet Med* 21(2): 103-113.
- Berggren, E. K. and K. A. Boggess (2013). "Oral agents for the management of gestational diabetes." *Clin Obstet Gynecol* 56(4): 827-836.

- Bernt, B. a. (1974). Lactate dehydrogenase. In: *Methods in Enzymatic Analysis*,. Academic Press. 978(2):574-9.
- Bifulco, G., C. Di Carlo, et al. (2002). "Glucose regulates insulin mitogenic effect by modulating SHP-2 activation and localization in JAr cells." *J Biol Chem* 277(27): 24306-24314.
- Blagosklonny, M. V. (2013). "TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists." *Cell Death Dis* 35(4): 964-972
- Boucher, J., A. Kleinridders, et al. (2014). "Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(1): 1011-1023.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72(3): 248-254.
- Buchanan, T. A., A. Xiang, et al. (2007). "What is gestational diabetes?" *Diabetes Care* 30(2): 105-111.
- Buchanan, T. A. and A. H. Xiang (2005). "Gestational diabetes mellitus." *J Clin Invest* 115(3): 485-491.
- Calviello, G., P. Palozza, et al. (1998). "Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis." *Int J Cancer* 75(5): 699-705.
- Cameo, P., P. Bischof, et al. (2003). "Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture." *Biol Reprod* 68(2): 472-477.
- Carlson, C. J., S. Koterski, et al. (2003). "Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression." *Diabetes* 52(3): 634-641.
- Cauzac, M., D. Czuba, et al. (2003). "Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation." *Placenta* 24(4): 378-384.
- Cederberg, J., C. M. Siman, et al. (2001). "Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy." *Pediatr Res* 49(6): 755-762.
- Cefalu, W. T. (2006). "Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition." *ILAR J* 47(3): 186-198.
- Chen, H., Y. Wu, et al. (2014). "Adiponectin exerts antiproliferative effect on human placenta via modulation of the JNK/c-Jun pathway." *Int J Clin Exp Pathol* 7(6): 2894-2904.

- Colomiere, M., M. Permezel, et al. (2009). "Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus." *Eur J Endocrinol* 160(4): 567-578.
- Cudmore, M. J., W. Ramma, et al. (2012). "Resveratrol inhibits the release of soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt-1) from human placenta." *Am J Obstet Gynecol* 206(3): 253 e210-255.
- Cusi, K., K. Maezono, et al. (2000). "Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle." *J Clin Invest* 105(3): 311-320.
- Desoye, G. and S. Hauguel-de Mouzon (2007). "The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network." *Diabetes Care* 30(2): 120-126.
- Duttaroy, A. K. (2009). "Transport of fatty acids across the human placenta: a review." *Prog Lipid Res* 48(1): 52-61.
- Ebisch, I. M., C. M. Thomas, et al. (2007). "The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility." *Hum Reprod Update* 13(2): 163-174.
- Emiliani, S., A. Delbaere, et al. (2005). "Embryo-maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive." *Reprod Biomed Online* 10(4): 527-540.
- Fernandez-Morera, J. L., S. Rodriguez-Rodero, et al. (2010). "The possible role of epigenetics in gestational diabetes: cause, consequence, or both." *Obstet Gynecol Int* 38(7): 605-612.
- Finstad, H. S., C. A. Drevon, et al. (1998). "Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cells incubated with eicosapentaenoic acid." *Biochem J* 336 (Pt 2): 451-459.
- Forbes, K., V. K. Shah, et al. (2015). "Statins inhibit insulin-like growth factor action in first trimester placenta by altering insulin-like growth factor 1 receptor glycosylation." *Mol Hum Reprod* 21(1): 105-114.
- Forbes, K. and M. Westwood (2010). "Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth." *J Endocrinol* 207(1): 1-16.
- Forouhi, N. G. and N. J. Wareham (2014). "Epidemiology of diabetes." *Medicine (Abingdon)* 42(12): 698-702.
- Franz, M. J., J. P. Bantle, et al. (2003). "Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications." *Diabetes Care* 26(1): 51-61.

- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review." *Cancer Detect Prev* 30(3): 217-223.
- Gavin, A. R., C. Holzman, et al. (2009). "Maternal depressive symptoms, depression, and psychiatric medication use in relation to risk of preterm delivery." *Womens Health Issues* 19(5): 325-334.
- Goncalves, P., T. Catarino, et al. (2012). "Inhibition of butyrate uptake by the primary bile salt chenodeoxycholic acid in intestinal epithelial cells." *J Cell Biochem* 113(9): 2937-2947.
- Graham, C. H., T. S. Hawley, et al. (1993). "Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan." *Exp Cell Res* 206(2): 204-211.
- Greenberg, J. A., S. J. Bell, et al. (2011). "Folic Acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention." *Rev Obstet Gynecol* 4(2): 52-59.
- Gude, N. M., C. T. Roberts, et al. (2004). "Growth and function of the normal human placenta." *Thromb Res* 114(5-6): 397-407.
- Hellmuth, E., P. Damm, et al. (2000). "Oral hypoglycaemic agents in 118 diabetic pregnancies." *Diabet Med* 17(7): 507-511.
- Henson, M. C. and V. D. Castracane (2006). "Leptin in pregnancy: an update." *Biol Reprod* 74(2): 218-229.
- Hiden, U., E. Glitzner, et al. (2009). "Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies." *J Anat* 215(1): 60-68.
- Hiden, U., E. Glitzner, et al. (2008). "MT1-MMP expression in first-trimester placental tissue is upregulated in type 1 diabetes as a result of elevated insulin and tumor necrosis factor-alpha levels." *Diabetes* 57(1): 150-157.
- Hills, F. A., M. G. Elder, et al. (2004). "Regulation of human villous trophoblast by insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding protein-1." *J Endocrinol* 183(3): 487-496.
- Huppertz, B. (2008). "Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis." *Hypertension* 51(4): 970-975.
- Hutson, J. R., B. Stade, et al. (2012). "Folic acid transport to the human fetus is decreased in pregnancies with chronic alcohol exposure." *PLoS One* 7(5): e38057.
- James, J. L., A. M. Carter, et al. (2012). "Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation?" *Placenta* 33(5): 327-334.

- Jia, D. Y., H. J. Liu, et al. (2008). "Folic acid supplementation affects apoptosis and differentiation of embryonic neural stem cells exposed to high glucose." *Neurosci Lett* 440(1): 27-31.
- Johnsen, G. M., S. Basak, et al. (2011). "Docosahexaenoic acid stimulates tube formation in first trimester trophoblast cells, HTR8/SVneo." *Placenta* 32(9): 626-632.
- Jones, H. N., T. Jansson, et al. (2010). "Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino Acid transport in human primary trophoblast cells." *Diabetes* 59(5): 1161-1170.
- Jones, M. L., P. J. Mark, et al. (2014). "Maternal dietary omega-3 fatty acids and placental function." *Reproduction* 147(5): R143-152.
- Kaaja, R. and T. Ronnema (2008). "Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring." *Rev Diabet Stud* 5(4): 194-202.
- Kanetkar, P., R. Singhal, et al. (2007). "Gymnema sylvestre: A Memoir." *J Clin Biochem Nutr* 41(2): 77-81.
- Keating, E., P. Goncalves, et al. (2007). "Progesterone inhibits folic acid transport in human trophoblasts." *J Membr Biol* 216(2): 143-152.
- Kenis, I., S. Tartakover-Matalon, et al. (2005). "Simvastatin has deleterious effects on human first trimester placental explants." *Hum Reprod* 20(10): 2866-2872.
- King, A. J. (2012). "The use of animal models in diabetes research." *Br J Pharmacol* 166(3): 877-894.
- Klingler, M., A. Blaschitz, et al. (2006). "The effect of docosahexaenoic acid and folic acid supplementation on placental apoptosis and proliferation." *Br J Nutr* 96(1): 182-190.
- Knofler, M. (2010). "Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion." *Int J Dev Biol* 54(2): 269-280.
- Knofler, M., B. Mosl, et al. (2000). "TNF-alpha/TNFR1 in primary and immortalized first trimester cytotrophoblasts." *Placenta* 21(5): 525-535.
- Kooptiwut, S., M. Kebede, et al. (2005). "High glucose-induced impairment in insulin secretion is associated with reduction in islet glucokinase in a mouse model of susceptibility to islet dysfunction." *J Mol Endocrinol* 35(1): 39-48.
- Lager, S. and T. L. Powell (2012). "Regulation of nutrient transport across the placenta." *J Pregnancy* 10(6): 1798-1812.
- Langer, O., D. L. Conway, et al. (2000). "A comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus." *N Engl J Med* 343(16): 1134-1138.

- Magarinos, M. P., V. Sanchez-Margalet, et al. (2007). "Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells." *Biol Reprod* 76(2): 203-210.
- Magon, N. and M. Chauhan (2012). "Pregnancy in Type 1 Diabetes Mellitus: How Special are Special Issues?" *N Am J Med Sci* 4(6): 250-256.
- Manach, C., A. Scalbert, et al. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." *Am J Clin Nutr* 79(5): 727-747.
- Mandl, M., J. Haas, et al. (2002). "Serum-dependent effects of IGF-I and insulin on proliferation and invasion of human first trimester trophoblast cell models." *Histochem Cell Biol* 117(5): 391-399.
- Masumoto, A., N. Takamoto, et al. (2011). "Effects of intermittent high glucose on BeWo choriocarcinoma cells in culture." *J Obstet Gynaecol Res* 37(10): 1365-1375.
- Mayama, R., T. Izawa, et al. (2013). "Improvement of insulin sensitivity promotes extravillous trophoblast cell migration stimulated by insulin-like growth factor-I." *Endocr J* 60(3): 359-368.
- Metzger, B. E., T. A. Buchanan, et al. (2007). "Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus." *Diabetes Care* 30(2): 251-260.
- Metzger, B. E., L. P. Lowe, et al. (2008). "Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes." *N Engl J Med* 358(19): 1991-2002.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Murakami, M., T. Ichisaka, et al. (2004). "mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* 24(15): 6710-6718.
- Negrato, C. A. and M. B. Gomes (2013). "Historical facts of screening and diagnosing diabetes in pregnancy." *Diabetol Metab Syndr* 5(1): 22-30.
- Nomura, M., T. Takahashi, et al. (2008). "Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells." *Biol Pharm Bull* 31(7): 1403-1409.
- Nordstrand, A., M. Lundholm, et al. (2013). "Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor enhances effects of simvastatin on prostate cancer cells in co-culture with bone." *Cancer Microenviron* 6(3): 231-240.

- Perez-Perez, A., J. Maymo, et al. (2008). "Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway." *Arch Biochem Biophys* 477(2): 390-395.
- Perez-Perez, A., J. Maymo, et al. (2013). "Insulin enhances leptin expression in human trophoblastic cells." *Biol Reprod* 89(1): 20-28
- Pessin, J. E. and A. R. Saltiel (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance." *J Clin Invest* 106(2): 165-169.
- Pratley, R. E. (2013). "The early treatment of type 2 diabetes." *Am J Med* 126(9 Suppl 1): S2-9.
- Ramadori, G., L. Gautron, et al. (2009). "Central administration of resveratrol improves diet-induced diabetes." *Endocrinology* 150(12): 5326-5333.
- Rice, G. E., S. E. Illanes, et al. (2012). "Gestational diabetes mellitus: a positive predictor of type 2 diabetes?" *Int J Endocrinol* 24(10): 1155-1165
- Rossant, J. and J. C. Cross (2001). "Placental development: lessons from mouse mutants." *Nat Rev Genet* 2(7): 538-548.
- Sacks, D. A., D. R. Hadden, et al. (2012). "Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel-recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study." *Diabetes Care* 35(3): 526-528.
- Sanchez, S. E., C. Zhang, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha soluble receptor p55 (sTNFp55) and risk of preeclampsia in Peruvian women." *J Reprod Immunol* 47(1): 49-63.
- Sastry, B. V. (1999). "Techniques to study human placental transport." *Adv Drug Deliv Rev* 38(1): 17-39.
- Scalbert, A., I. T. Johnson, et al. (2005). "Polyphenols: antioxidants and beyond." *Am J Clin Nutr* 81(1): 215-217.
- Schulz, L. C. and E. P. Widmaier (2004). "The effect of leptin on mouse trophoblast cell invasion." *Biol Reprod* 71(6): 1963-1967.
- Seki, H., K. Matuoka, et al. (2007). "TNF-alpha from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line." *J Obstet Gynaecol Res* 33(4): 408-416.
- Serrano-Rios, M., A. Goday, et al. (1999). "Migrant populations and the incidence of type 1 diabetes mellitus: an overview of the literature with a focus on the Spanish-heritage countries in Latin America." *Diabetes Metab Res Rev* 15(2): 113-132.

- Sharma, S., C. S. Misra, et al. (2011). "Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT1 activator in a genetic model for type-2 diabetes." *Phytother Res* 25(1): 67-73.
- Singh, C. K., A. Kumar, et al. (2013). "Diabetic complications in pregnancy: is resveratrol a solution?" *Exp Biol Med (Maywood)* 238(5): 482-490.
- Singh, M., P. Chaudhry, et al. (2011). "Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors." *J Endocrinol* 210(1): 5-14.
- Staun-Ram, E. and E. Shalev (2005). "Human trophoblast function during the implantation process." *Reprod Biol Endocrinol* 120 (3): 3-15.
- Straus, D. S. (1981). "Effects of insulin on cellular growth and proliferation." *Life Sci* 29(21): 2131-2139.
- Stubert, J., K. Waldmann, et al. (2014). "Progranulin shows cytoprotective effects on trophoblast cells in vitro but does not antagonize TNF-alpha-induced apoptosis." *Arch Gynecol Obstet* 290(5): 867-873.
- Swanson, D., R. Block, et al. (2012). "Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life." *Adv Nutr* 3(1): 1-7.
- Taniguchi, C. M., B. Emanuelli, et al. (2006). "Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 85-96.
- Tartakover-Matalon, S., N. Cherepnin, et al. (2007). "Impaired migration of trophoblast cells caused by simvastatin is associated with decreased membrane IGF-I receptor, MMP2 activity and HSP27 expression." *Hum Reprod* 22(4): 1161-1167.
- Tessier, D. R., Z. M. Ferraro, et al. (2013). "Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity." *Placenta* 34(3): 205-211.
- Tracy L. Setji, M., Ann J. Brown, MD and Mark N. Feinglos, MD, CM (2005). "Gestational Diabetes Mellitus." *Clinical Diabetes* 10 (23) 17-24.
- Tsao, R. (2010). "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols." *Nutrients* 2(12): 1231-1246.
- Vambergue, A. and I. Fajardy (2011). "Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight." *World J Diabetes* 2(11): 196-203.
- van Dijk, M. and C. Oudejans (2014). "(Epi)genetic control of human trophoblast invasion." *Front Genet* 38(5): 38-39.
- Vargas, R., J. T. Repke, et al. (2010). "Type 1 diabetes mellitus and pregnancy." *Rev Obstet Gynecol* 3(3): 92-100.

- Vicente L, B. J. (2011). "Diagnóstico e conduta na Diabetes Gestacional." Lisboa: Direção-Geral da Saúde.
- Vogel, T. (2013). Insulin/IGF-Signalling in Embryonic and Adult Neural Proliferation and Differentiation in the Mammalian Central Nervous System 10(2): 5772-5815
- Wagener, J., W. Yang, et al. (2013). "CCN3 regulates proliferation and migration properties in Jeg3 trophoblast cells via ERK1/2, Akt and Notch signalling." *Mol Hum Reprod* 19(4): 237-249.
- Wen, H. Y., S. Abbasi, et al. (2005). "mTOR: a placental growth signaling sensor." *Jornal of physiology* 582 (1): 63-69.
- Williams, P. J., J. N. Bulmer, et al. (2011). "Possible roles for folic acid in the regulation of trophoblast invasion and placental development in normal early human pregnancy." *Biol Reprod* 84(6): 1148-1153.
- Wong, D. H., J. A. Villanueva, et al. (2010). "Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells." *Mol Hum Reprod* 16(4): 251-259.
- Ye, L., B. Varamini, et al. (2012). "Rapamycin has a biphasic effect on insulin sensitivity in C2C12 myotubes due to sequential disruption of mTORC1 and mTORC2." *Front Genet* 10(3): 177-187.
- Yessoufou, A. and K. Moutairou (2011). "Maternal diabetes in pregnancy: early and long-term outcomes on the offspring and the concept of "metabolic memory"." *Exp Diabetes Res* 10(6): 1155-1167
- Youl, E., G. Bardy, et al. (2010). "Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic beta-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway." *Br J Pharmacol* 161(4): 799-814.
- Yui, J., M. Garcia-Lloret, et al. (1994). "Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts." *Placenta* 15(8): 819-835.
- Zhang, C., A. A. Wendel, et al. (2012). "Glycerolipid signals alter mTOR complex 2 (mTORC2) to diminish insulin signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(5): 1667-1672.
- Zhao, J. P., E. Levy, et al. (2014). "Circulating docosahexaenoic acid levels are associated with fetal insulin sensitivity." *PLoS One* 9(1): 8505-8512.
- Zhu, J. Y., Z. J. Pang, et al. (2012). "Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases." *Rev Obstet Gynecol* 5(3-4): 137-143.