

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE NLRP3
EM MODELO *in vitro* DE PRÉ-ECLÂMPSIA**

Aluna: JULIANA QUINTANEIRO BIZZOTTO

**Orientadora: VALÉRIA CRISTINA SANDRIM
Coorientadora: PRISCILA REZECK NUNES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de
Bacharel em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Bizzotto, Juliana Quintaneiro.

Avaliação da expressão proteica de NLRP3 em modelo *in vitro*
de pré-eclâmpsia / Juliana Quintaneiro Bizzotto. - Botucatu,
2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Valéria Cristina Sandrim

Coorientador: Priscila Rezeck Nunes

Capes: 20000006

1. Proteínas - Análise. 2. *Western blotting*.
3. Inflamassomos. 4. Pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: BAY 11-7821; Glibenclamida; Inflamassoma;
MCC950; Pré-eclâmpsia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 PRÉ-ECLÂMPsia.....	3
1.2 INFLAMASSOMA.....	4
1.3 RELAÇÃO DO INFLAMASSOMA COM PRÉ-ECLÂMPsia.....	6
2. METODOLOGIA.....	10
2.1 CASUÍSTICA.....	10
2.2 COLHEITA DE SANGUE.....	12
2.3 CULTIVO DE LINHAGEM CELULAR HUVEC.....	13
2.4 OBTENÇÃO DO LISADO DE CÉLULAS.....	13
2.5 ELETROFORESE E BLOTTING.....	13
2.6 INIBIÇÃO DA VIA DO NF- κ B.....	14
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
3. RESULTADO.....	12
4. DISCUSSÃO.....	16
5. CONCLUSÃO.....	19

**“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”**

(Arthur Schopenhauer)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus orixás que me guiam e protegem em cada passo dado em minha vida me ensinando através do amor e caridade a dar sempre o melhor de mim.

Agradeço aos meus pais, Vani e Carlos, e meus irmãos que são minha base de tudo e sempre se fizeram presentes mesmo com a distância física, serei eternamente grata por cada ensinamento e acolhimento nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus amigos que se tornaram família, em especial Beatriz, Rafael, Lorena e Estela que me acompanham desde o primeiro dia na faculdade e trilharam esse caminho lado a lado comigo tornando tudo mais leve e divertido.

Agradeço ao laboratório e minha equipe de trabalho, sem vocês, esse trabalho não teria sido realizado. Agradeço em especial minha orientadora Valéria Cristina Sandrim, que me acolheu em um momento de muita dúvida e insegurança sobre qual caminho seguir. Agradeço também minha coorientadora Priscila Rezeck Nunes que me ensinou com muita paciência e dedicação e me acompanhou em cada passo deste trabalho.

Agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu pela oportunidade de poder contribuir com a ciência e por me formar como profissional e indivíduo social.

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade neonatal e materna no mundo, tendo maior prevalência em países de menor poder socioeconômico, atingindo cerca de 6-10% das gestações no mundo. O principal sintoma que contribui para o diagnóstico é a hipertensão arterial a partir da 20ª semana, em gestantes previamente normotensas, associada a proteinúria. Contudo, a PE pode ser diagnosticada sem a presença de proteinúria quando a hipertensão arterial está associada, também, à disfunção de órgãos maternos ou à disfunção uteroplacentária. Essa síndrome não apresenta cura, sendo a indução do parto prematuro o principal desfecho da doença. Apesar de sua alta prevalência, sua fisiopatologia ainda não é muito bem elucidada. Entretanto, sabe-se que a PE é causada por invasão trofoblástica inadequada que culmina em falha na remodelação vascular, podendo levar à má perfusão e isquemia placentária, resultando em disfunção endotelial. Esse processo é fundamental na fisiopatologia da doença, visto que pode levar a liberação, no sangue da gestante, de solutos, debris, DNA fetal e células. Esses eventos, por sua vez, agem como mediadores inflamatórios que ativam o sistema imune inato atuando como padrões moleculares associados a danos (*damage-associated molecular patterns* - DAMPs) que serão reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors* - PRRs) presentes nas células. Após esse reconhecimento, há a formação do complexo proteico que medeia o processo inflamatório denominado inflamassoma, que irá responder aos sinais liberados por estímulo dos produtos presentes no sangue. Na literatura, o inflamassoma mais bem estudado e descrito é o NLRP3 (*nod-like receptor protein 3*) composto pela ASC, NLRP3 e pró-caspase 1, que quando ativado inicia o processo de síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18. Tendo em vista que o inflamassoma é essencial para o desenvolvimento do processo inflamatório, que o torna então agente agravador da PE, o seguinte trabalho tem como objetivo avaliar a expressão das seguintes proteínas: NLRP3, caspase-1 e HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*). Para isso, será utilizada a técnica de Western blot a fim de identificar e comparar a expressão de proteínas desse complexo em células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) incubadas com pool de plasma de gestantes com PE e gestantes saudáveis (GS). Além disso, também serão avaliados os efeitos de três drogas como possíveis abordagens terapêuticas utilizando o inflamassoma como alvo, sendo elas a glibenclamida (inibidor inespecífico do NLRP3), o MCC950 (um inibidor específico) e por fim o BAY 11-7821,

conhecido por ser um potente inibidor do NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), envolvido em uma das vias de ativação do complexo. Com relação a menor expressão de caspase-1 em células incubadas com plasma de PE, o MCC950 apresentou maior eficácia, o que não foi observado na expressão de NLRP3, cuja droga mais eficaz foi o BAY 11-7821. Os dados do HMGB1 foram mais complexos podendo ser vinculados a eventos de piroptose. Dessa forma, estes resultados ajudam não somente a elucidar o processo inflamatório envolvido na PE, como também abrir possibilidades de tratamento para um dos maiores desafios clínicos da gestação.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença multifatorial e multissistêmica, específica da gestação. A síndrome é considerada a principal causa de morbidade e mortalidade materna e neonatal no mundo, tendo maior prevalência em países de média ou baixa renda. Em escala mundial, aproximadamente 4 milhões de gestantes são diagnosticadas com a doença e anualmente ela culmina na morte de mais de 70.000 mulheres e 500.000 bebês (DIMITRIADIS et al., 2023), e no Brasil atinge cerca de 8,2% das gestações (GUIDA et al., 2022). Além disso, quando o desfecho não é a morte da gestante e/ou do feto, esses indivíduos podem apresentar sérios riscos à saúde, como doenças cardiovasculares e risco de derrame para a mãe, e atrasos no neurodesenvolvimento e doenças metabólicas para o bebê. A PE é caracterizada pela presença de hipertensão (pressão arterial $\geq 140 \times 90$ mmHg), em gestantes normotensas, acompanhada de presença de proteinúria a partir da 20ª semana de gestação ou nos primeiros dias após o parto. Em alguns casos a proteinúria pode não estar presente, mas o diagnóstico pode ser dado pela associação da hipertensão com disfunção uteroplacentária ou disfunção de órgãos maternos, como insuficiência renal, envolvimento hepático, restrição do crescimento fetal ou complicações neurológicas (MOL et al., 2016).

Apesar de sua alta prevalência, a fisiopatologia da PE ainda não é muito bem descrita na literatura. Atualmente a doença é classificada conforme a idade gestacional, sendo pré-termo quando diagnosticada antes de 37 semanas, termo, quando diagnosticada a partir da 37ª semana e pós- parto (ACOG, 2020). Outra forma de classificação é conforme os sintomas, sendo PE leve quando a pressão arterial se apresenta acima de 140/90 mmHg e associada a proteinúria (≥ 300 mg/dia) ou PE grave quando a pressão arterial está maior que 160/110 mmHg associada a hemólise ou síndrome HELLP (DIMITRIADIS et al., 2023). Sabe-se que a PE não apresenta tratamento nem cura, tendo como opção profilática para PE, a recomendação do uso de sulfato de magnésio para prevenir convulsões (GEORGE; GRANGER, 2011; MAGEE et al., 2022). Com a ausência da cura, o parto prematuro se torna o principal desfecho da doença, contudo, essa abordagem pode trazer diversos riscos, já mencionados acima, tanto para a mãe quanto para o bebê.

Apesar de não ser muito bem elucidada, sabe-se que, a partir do segundo trimestre de gestação as artérias espiraladas maternas sofrem invasão trofoblástica, onde passarão por um processo de diferenciação de células epiteliais em células endoteliais. Esse processo é muito importante, pois ele torna as artérias qualificadas para garantir o fornecimento de sangue adequado para a placenta e, conseqüentemente, fornecer suprimento sanguíneo para o feto em desenvolvimento (ZHANG; SHI; DONG, 2023). Contudo, quando a invasão ocorre de forma inadequada, como no caso de gestantes com PE, ela culmina em falha na remodelação vascular acarretando má perfusão e hipóxia que se converte em isquemia placentária grave (GEORGE; GRANGER, 2011) resumindo-se em disfunção endotelial.

As células endoteliais são responsáveis por formar uma barreira entre o sangue e a matriz extravascular, quando essa barreira não é bem estruturada ocorre o extravasamento de debris, células e proteínas. Esses produtos liberados podem agir como mediadores inflamatórios, ativando o sistema imune inato. É sabido que esse sistema apresenta Receptores de Reconhecimento Padrão (RRPs) como os *toll-like receptors* (TLRs) e os *nod-like receptors* (NLRs) que respondem a sinais liberados por moléculas liberadas por patógenos (*pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs) ou células danificadas (*damage-associated molecular patterns* - DAMPs) (RAI; MATHEWS; AGRAWAL, 2022). Como resposta do sistema imune a esses sinais, ocorre a formação do complexo proteico denominado inflamassoma que irá mediar um intenso processo inflamatório.

1.2 Inflamassoma

O inflamassoma é um complexo proteico presente no sistema imune inato ativado em processos inflamatórios severos (BAI et al., 2020). Atualmente, o inflamassoma melhor descrito na literatura é o *nod-like receptor protein 3* (NLRP3), esse complexo apresenta em sua estrutura três principais proteínas, sendo elas a ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), a NLRP3 e o precursor pró-caspase-1. NLRP3 é um receptor citosólico composto de três partes: um domínio pirina (PYD) na região N-terminal, um domínio central de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NACHT) e um domínio de repetição rico em leucina (LRR) na região C-terminal (figura 1).

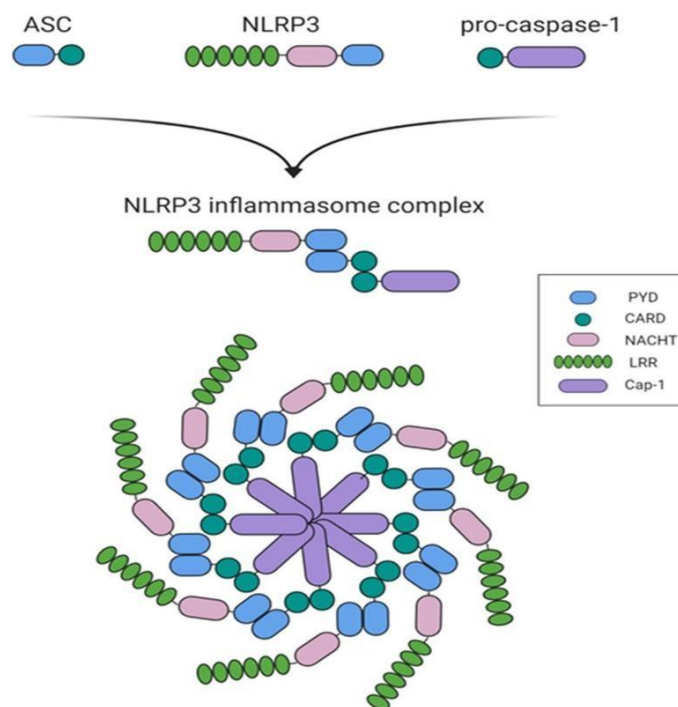


Figura 1. Estrutura do inflamassoma NLRP3. Constituído de proteína ASC, NLRP3 e precursor pró-caspase. Ao ser ativado, as moléculas interagem entre si, se polimerizam formando o complexo Inflamassoma NLRP3. O NLRP3 se liga à ASC por meio de interação PYD-PYD. O recrutamento da pró-caspase 1 ocorre por meio de interação CARD-CARD com a ASC (SEOK et al., 2021).

Esse complexo pode ser ativado por diversas moléculas como DAMPs e PAMPs, além de elementos patogênicos e espécies reativas de oxigênio (EROs), entre outros. Sua ativação ocorre, principalmente, por dois processos, o primeiro é através da ativação do NFκB (Fator Nuclear κ B) por meio dos receptores tipo NLR (*nod-like receptor*) ou TLR (*toll-like receptor*), o NFκB é capaz de interagir com diversos genes alterando sua transcrição, nesse contexto, ele aumenta a expressão de pró-IL-1β e NLRP3. Vale ressaltar que essas proteínas não são expressas constitutivamente nas células, ou seja, a pequena quantidade presente em células não estimuladas não é suficiente para a formação do inflamassoma.

Já no segundo processo, a ativação ocorre por meio de DAMPs, que interagem diretamente com NLRP3 e ASC, que se oligomerizam e ocorre a clivagem e conversão da pró-caspase 1 em caspase-1, que quando ativada, transforma pró-IL-1β e pró-IL-18 em suas formas atuantes que, juntamente com as espécies inflamatórias HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*) serão secretadas no meio extracelular e irão induzir um processo de morte celular programada denominado piropitose (SOCHA et al., 2020). A caspase-1 também ativa a gasdermina D que

é capaz de formar poros na membrana plasmática da célula, atuando como molécula executora da piroptose (figura 2). (PLACE; KANNEGANTI, 2018).

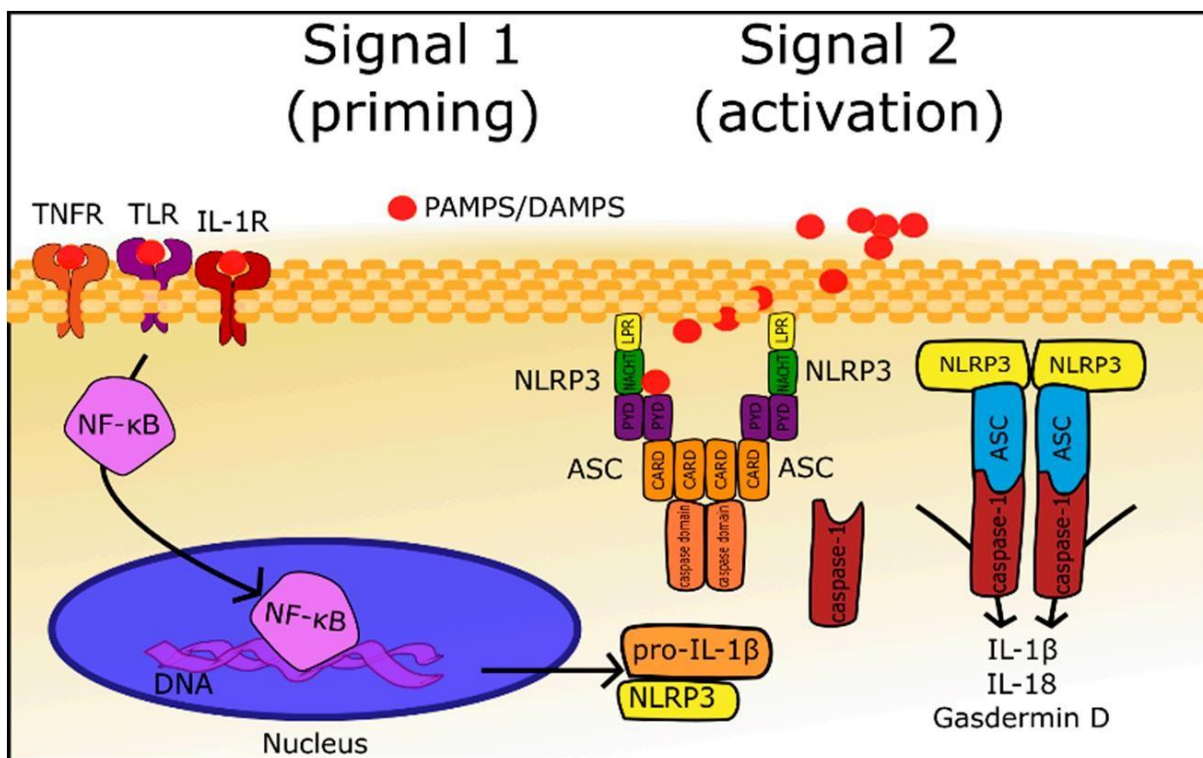


Figura 2. Mecanismo de formação e ativação do inflamassoma NLRP3. Sinal 1 (*priming*): ativação por meio do NF-κB (*nuclear factor kappa B*) por meio de ativação dos receptores TNFR (receptor de fator de necrose tumoral), TLR (*Toll-like receptor*) e IL-1R (*interleukin 1 receptor*) através de DAMPs/PAMPs. Sinal 2 (*activation*): DAMPs/PAMPs se conectam diretamente no NLRP3, mudando sua conformação levando a multimerização e formação do inflamassoma. A forma ativa do inflamassoma culmina na produção da forma ativa de IL-1β, IL-18 e gasdermina D. (SOCHA et al., 2020).

1.3 Relação do inflamassoma com a pré-eclâmpsia

A ativação do inflamassoma e a persistência da inflamação estimulam a secreção de diversos mediadores químicos, sendo um processo fundamental em diversas doenças, pois elas ativam múltiplos padrões de sinalização. Tendo em vista a liberação dessas espécies inflamatórias como IL-1β, IL-18 e HMGB1, que promovem o processo de morte celular programada, entende-se que a piroptose é uma importante via de morte de células endoteliais (SHI; GAO; SHAO, 2017). Além disso, estudos mostram que a inflamação vascular reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico (ON), que desempenha importante papel na dilatação de

vasos sanguíneos, isso ocorre devido ao excesso de produção de EROs que estão envolvidos no catabolismo de NO, e, conseqüentemente, ocorre um aumento da contração vascular culminando em maior pressão arterial, um dos principais sintomas da PE. Esse desbalanço entre EROs e NO aumenta a expressão de genes relacionados à inflamação que, por sua vez, prejudicam a função endotelial (figura 3). (SHIHATA et al., 2016).

Em resumo, é possível perceber que o inflamassoma e a redução de NO estão diretamente relacionados com a PE visto que esta tem como principal característica a disfunção endotelial, intensificada pelo desbalanço de NO, e pela ativação do inflamassoma que atua como mediador, contribuindo para um sistema de retroalimentação via ativação de espécies inflamatórias e tendo como produto final outras moléculas sinalizadoras de inflamação, intensificando o processo e podendo agravar a doença.

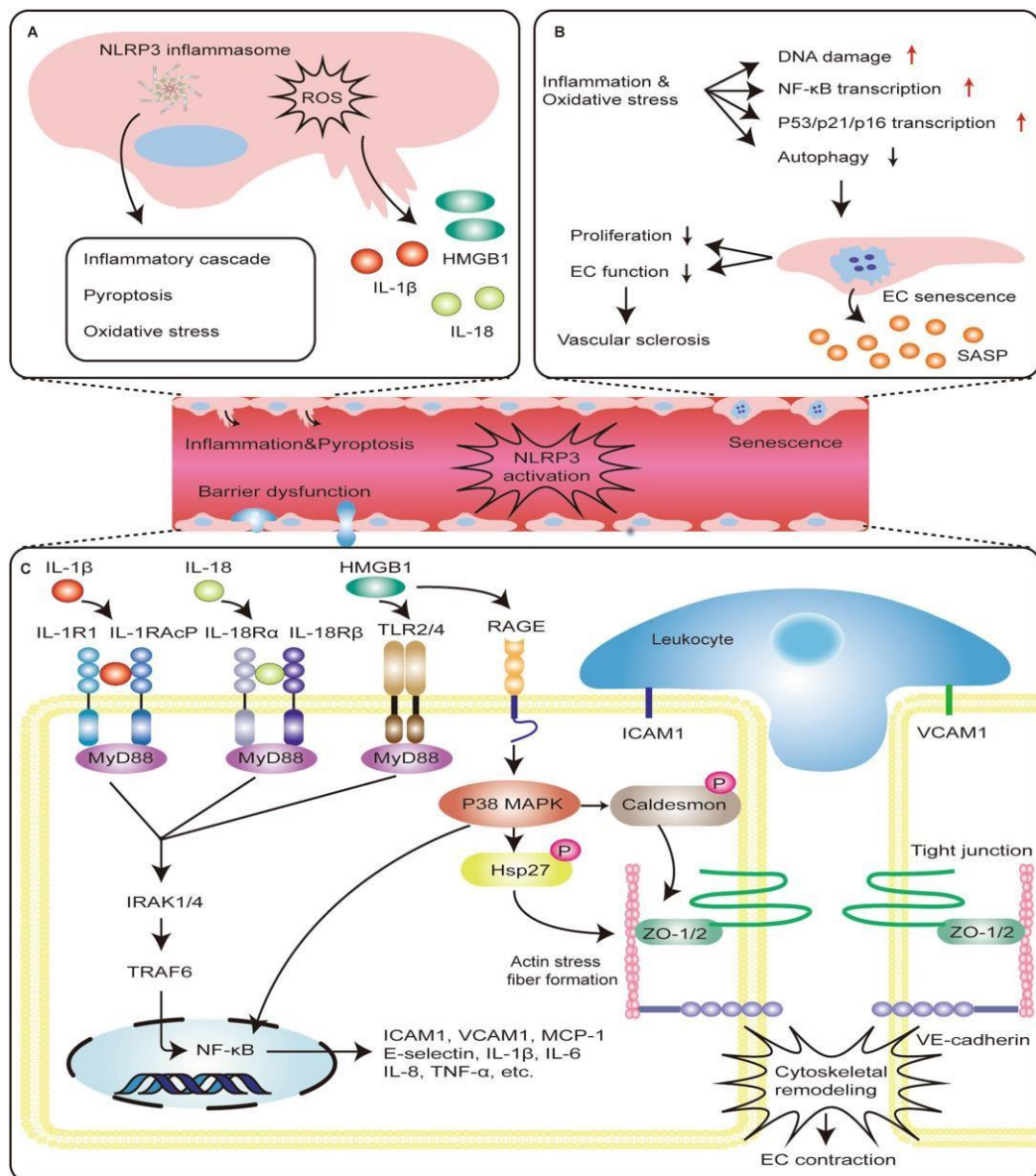


Figura 3. Papel da ativação do inflamassoma NLRP3 na disfunção endotelial. A secreção de formas maduras de IL-1 β , IL-18 e HMGB1 é o resultado da ativação do inflamassoma NLRP3. Esses mediadores possuem propriedades de ativação pró-inflamatória. A inflamação e o estresse oxidativo podem induzir danos ao DNA do endotélio, ativar a via de sinalização do NF- κ B e inibir a autofagia, o que pode promover o processo de senescência das células endoteliais. A ligação de IL-1 β ao seu receptor de superfície celular, receptor 1 de IL-1 (IL-1R1), recruta a proteína acessória do receptor de IL-1 (IL-1RacP) para ativar moléculas de sinalização intracelular, incluindo fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88). O HMGB1 também pode ativar a via de sinalização do NF- κ B, que está a jusante da ativação do receptor Toll-like (TLR) 2/4. A ativação da via de sinalização do NF- κ B aumenta a secreção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, para mediar a adesão de leucócitos e promover o extravasamento de leucócitos. Todas essas reações aumentam a permeabilidade endotelial, alterando a contratilidade celular e rompendo as conexões intercelulares (BAI et al., 2020).

Dada a importância do papel do inflamassoma no processo inflamatório que medeia a PE, em especial a hipertensão vascular, é preciso pensar em alternativas farmacológicas que reduzam ou inibam a ativação do inflamassoma a fim de controlar a inflamação. Nesse contexto, algumas drogas têm sido estudadas como possíveis abordagens terapêuticas (figura 4) como, por exemplo, a glibenclamida, droga da classe das sulfoniurêias de segunda geração, utilizada no tratamento da Diabetes Mellitus. Essa droga é capaz de inibir a ativação do NLRP3 devido ação no fechamento dos canais de potássio P2X7 sensíveis a adenosina trifosfato (ATP), aumentando a concentração intracelular de potássio e impedindo, consequentemente a agregação da proteína ASC e prevenindo a liberação de caspase-1 e IL-1 β (ZAHID et al., 2019), sendo considerada então um inibidor não-específico do NLRP3. Além da glibenclamida, outra alternativa é o inibidor específico MCC950, um composto contendo diarilsulfonilureia, que atua bloqueando o domínio ATPase do NLRP3 impedindo sua ativação pela via canônica e não-canônica promovendo o bloqueio da hidrólise de ATP e a oligomerização da ASC. Além disso, o MCC950 atua diretamente inibindo a caspase-1, que por sua vez é incapaz de clivar e liberar IL-1 β e IL-18 (COLL et al., 2019).

Por fim, outra possível estratégia é pensar em drogas que atuem na cascata de ativação do inflamassoma como o BAY 11-7082, uma fenilvinilsulfona, capaz de inibir a via NF- κ B por meio do bloqueio da atividade quinase do IKK β . Segundo estudos, essa droga inibe seu alvo por meio da alquilação de resíduos nucleofílicos importantes como a cisteína na região ATPase do NLRP3 (ZAHID et al., 2019).

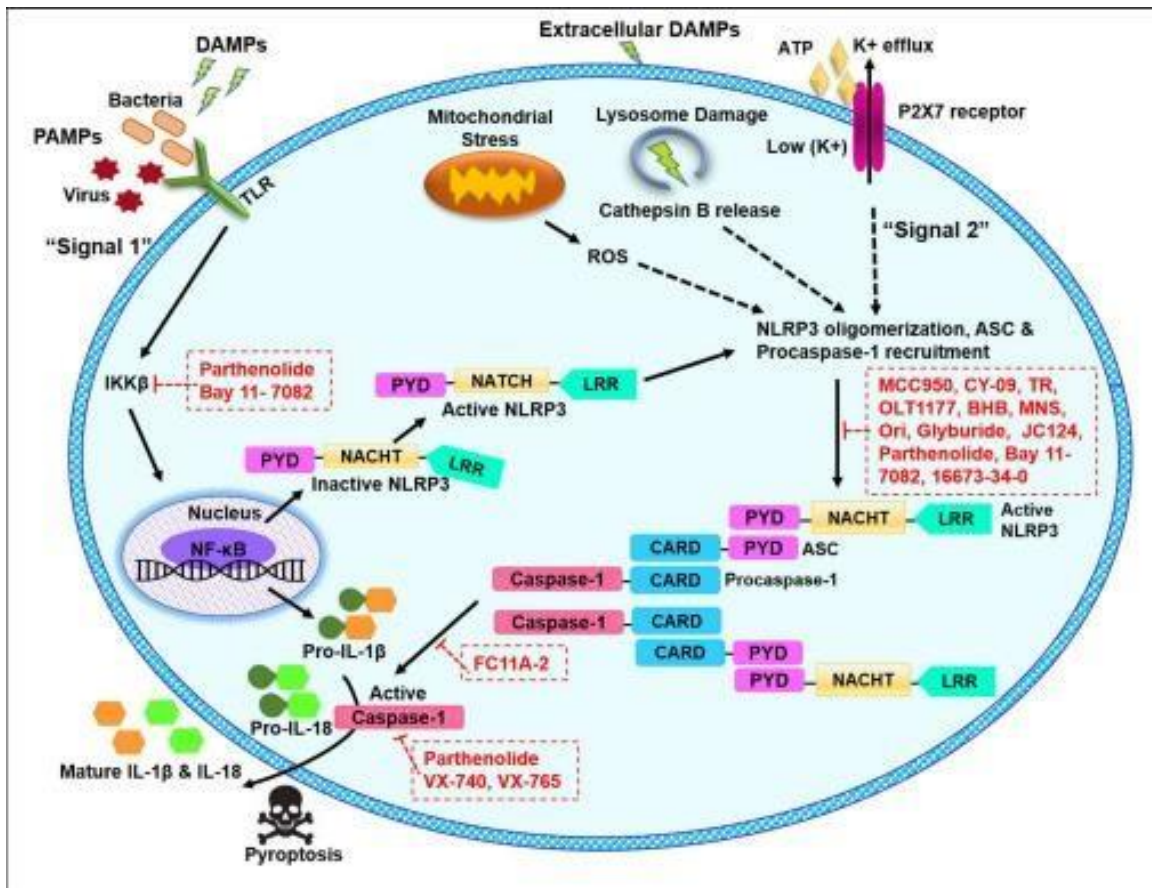


Figura 4. Ilustração esquemática da via do inflamassoma NLRP3 e potenciais alvos de bloqueio de vários inibidores farmacológicos. O sinal 1 ou o sinal de iniciação é mediado por PAMPs patogênicos de bactérias ou vírus ou DAMPs estéreis, resultando na regulação positiva da expressão de NLRP3 e pró-IL-1 β dependente de NF- κ B. O BAY 11-7082 atua como inibidor da atividade quinase no IKK β , impedindo ativação da via NF- κ B. O sinal 2, ou sinal de ativação mediado por numerosos estímulos de PAMPs ou DAMPs promove a oligomerização de NLRP3 e o recrutamento de ASC e pró-caspase-1, levando à ativação de NLRP3. O NLRP3 pode ser ativado em resposta ao efluxo extracelular de ATP e K⁺ através do canal P2X7 controlado por ATP, em resposta à liberação de catepsina B de lisossomos danificados ou em resposta a espécies reativas de oxigênio (EROs) liberadas de mitocôndrias danificadas. Esse canal é um possível alvo farmacológico para ação da glibenclamida inibindo a agregação da ASC. A ativação do inflamassoma NLRP3 resulta em caspase-1 ativa, que cliva as pró-formas de IL-1 β e IL-18 em suas formas maduras. O MCC950 pode atuar inibindo a atividade da caspase-1 (ZAHID et al., 2019).

Em resumo, é sabido que a PE é um processo inflamatório que desempenha papel desafiador na saúde gestacional, dessa forma é de suma importância o entendimento de sua fisiopatologia bem como definir o envolvimento do NLRP3 nesse processo. Ademais, é preciso

pensar em alternativas farmacológicas com intuito de reduzir os riscos da doença tanto para a mãe quanto para o bebê. Nesse sentido, o objetivo do trabalho é avaliar a expressão das proteínas: NLRP3, caspase-1 e HMGB1 em células HUVEC cultivadas com plasma de PE e gestantes saudáveis, bem como, avaliar os efeitos das drogas glibenclâmida, MCC950 e BAY 11-7082 sobre as proteínas com o objetivo de determinar a melhor abordagem na prevenção da inflamação.

2. METODOLOGIA

2.1 Casuística

Foram estudadas 10 gestantes portadoras de PE e 10 gestantes saudáveis (GS) que realizaram a assistência ao parto cesáreo na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e confirmada por exame ultrassonográfico precoce (<12 semanas de gestação). Uma gestante foi considerada portadora de PE quando, manifestou hipertensão arterial ($\geq 140 \times 90$ mmHg) associada à proteinúria (≥ 300 mg em urina de 24 horas) ou outros acometimentos maternos após a 20ª semana de gestação (ACOG, 2020).

O cálculo do tamanho amostral foi realizado considerando que a diferença desejada entre os grupos estudados fosse de um desvio padrão da média dos valores observados no grupo padrão. Admitindo-se um nível de significância de 5% e poder de 80%, foram necessárias 10 amostras por grupo. Todas as mulheres envolvidas no estudo (PE e GS) foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (nº 4.961.945/21).

Critérios de inclusão:

Gestantes com PE: gestação única, com idade gestacional entre 24 e 40 semanas, com diagnóstico de PE sem apresentar qualquer outra patologia clínica ou obstétrica.

Gestantes saudáveis (GS): mulheres com gestação única, com idade gestacional entre 24 e 40 semanas, não ter o diagnóstico de PE sem apresentar patologias clínicas ou obstétricas.

Critérios de não-inclusão:

Os critérios de não-inclusão para todas as gestantes (PE e GS) foram: apresentação de

qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, tais como: gestação gemelar, PE anterior, hipertensão arterial crônica, diabetes, doenças renais, doenças infecciosas, má-formação fetal, soropositividade para vírus da imunodeficiência humana (HIV) e uso de drogas e álcool.

2.2 Colheita de sangue

A colheita de sangue periférico das gestantes (20 mL) foi realizada por punção venosa em tubo estéril contendo 158 unidades de Heparina de Sódio (BD Vacutainer, Franklin Lakes, EUA) para armazenamento do plasma das gestantes pré-eclâmpticas no momento do diagnóstico da doença e gestantes saudáveis normotensas pareadas pela idade gestacional. O sangue periférico foi centrifugado e o plasma e o soro obtidos foram armazenados a -80 °C até o momento da incubação com as células endoteliais.

2.3 Cultivo de linhagem celular HUVEC

HUVEC EA.hy 926 foram adquiridas com certificação de que elas são células desta linhagem. As células foram cultivadas a 37°C em CO₂ 5% em meio DMEM/F12 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 100uL/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mMol/L de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). Para o momento de realização dos experimentos, as células foram incubadas em concentração 1x10⁶ por poço a 37°C em CO₂ 5% em meio sem SFB, mas suplementado com pool de plasma (20%) de gestantes com PE e GS por 24 horas. As células incubadas com glibenclamida 100 µM, MCC950 10µM e BAY 11-7082 10µM foram tratadas por 30 minutos e em seguida suplementadas com pool de plasma de gestantes com PE por 24 horas.

2.4 Obtenção do lisado de células

As HUVECs cultivadas na presença ou ausência de plasma das gestantes e tratadas com MCC950, glibenclamida e BAY 11-7082 foram submetidas à lise celular empregando-se tampão de lise constituído por ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1mM, 0,5% Triton X-100, 10µg/mL Leupeptina, 10µg/mL Pepstatina, 100uM Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) e aprotinina 3 µg/mL (Sigma-Aldrich) em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2 – 7,4. O extrato celular obtido foi centrifugado a 1500g por 10 minutos. Em seguida, o material foi aliqotado em microtubos de 0,5 mL e as alíquotas foram armazenadas a – 80°C. O

sobrenadante obtido das células foi utilizado para determinação da concentração de proteína total pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.5 Eletroforese e Blotting

Após a determinação da concentração proteica do lisado de células, 30µg de proteínas foram tratadas com solução tampão para corrida de gel (Laemli sample buffer – Biorad, Hércules, EUA) e β-mercaptoetanol a 95°C por 5 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE (extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida) e após a eletroforese, transferidas para a membrana de PVDF. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em leite desnatado 5% em tampão Tris-HCl contendo 0,1% de tween 20 (TBS-T) por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas, por 18 horas, com os anticorpos primários antígeno-específicos policlonais de coelho: anti-NLRP3, anti-caspase-1, anti-HMGB1, (Cell Signaling, Massachusetts, EUA) na diluição ou concentração recomendada pelo fabricante contendo TBS-T. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico anti-IgG diluído em TBS-T por 1 hora. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit luminescente Supersignal West Femto Max Imum Sensitivity (Waltham, Massachusetts, EUA) e analisados por fotodocumentador. Os valores da análise de densitometria de banda das proteínas-alvo serão divididos pelos valores da proteína endógena gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a partir dos valores obtidos os grupos serão normalizados pela média do controle (*n-fold change*).

2.6 Inibição da via do NF-κB

Após a determinação das proteínas relacionadas à ativação de NLRP3, foi realizado um ensaio utilizando um inibidor de NF-κB (BAY 11-7821) para avaliar a participação dessa via na ativação desse complexo, também utilizando a análise de expressão proteica por Western Blot, conforme descrito acima. Foi realizado o cultivo das HUVEC na presença do inibidor. Um experimento piloto foi realizado para padronização da concentração do inibidor sendo testadas as concentrações de 10, 20 e 30 µM. Posteriormente foi visto que a menor concentração foi suficiente para avaliação do efeito inibidor.

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, como os valores apresentaram distribuição normal, então foram analisados por estatística paramétrica. A análise estatística foi feita por meio de ANOVA de uma via, seguido de pós-teste Bonferroni. O nível de significância adotado para os testes empregados foi de 5% ($p < 0,05$).

2 RESULTADOS

O experimento obteve no total 6 grupos: grupo controle (CTRL), grupo tratado com plasma de NT (NT), grupo tratado com plasma de PE (PE) e grupo tratado com plasma de PE e glibenclamida (PE+GB), grupo tratado com PE e MCC (PE+MCC), grupo tratado com PE e Bay 11-7082 (PE+BAY). As proteínas alvo caspase-1, NLRP3 e HMGB1, estão expressas em todos os grupos tratados e controle, em diferentes intensidades que são avaliadas estatisticamente e observadas nas figuras 5, 6 e 7.

A caspase-1 (figura 5) e o NLRP3 (figura 6) apresentam maior expressão no grupo tratado somente com plasma de PE, indicando que esse grupo apresenta maior grau de inflamação em relação aos outros. Já o HMGB1 (figura 7) apresentou maior expressão no grupo PE+BAY. A expressão da caspase-1 no grupo PE apresentou diferença estatística somente com relação ao grupo PE+MCC e tendência a ser mais expressa no grupo PE com relação ao GS, tendência que também se observa na expressão do HMGB1 que também apresentou diferença estatística somente entre dois grupos, PE e PE+BAY. Já o NLRP3 obteve resposta diferente das outras proteínas alvo, sendo possível identificar diferença estatística em todos os grupos. Quando analisamos a expressão do NLRP3 comparando o grupo de maior expressão, PE, com os grupos tratados com drogas é possível notar que todos tiveram diferença sendo a de maior significância a diferença entre PE e PE+BAY. Quando comparamos o grupo PE com os grupos CTRL e GS também há diferenças, sendo que a diferença de expressão relativa de NLRP3 no grupo PE com relação ao grupo CTRL é de maior significância do que a diferença de expressão da proteína entre os grupos PE e GS. Por fim, quando comparados os grupos CTRL e GS entre si, também é possível identificar diferenças estatísticas sendo o grupo GS o que obteve maior expressão relativa do NLRP3.

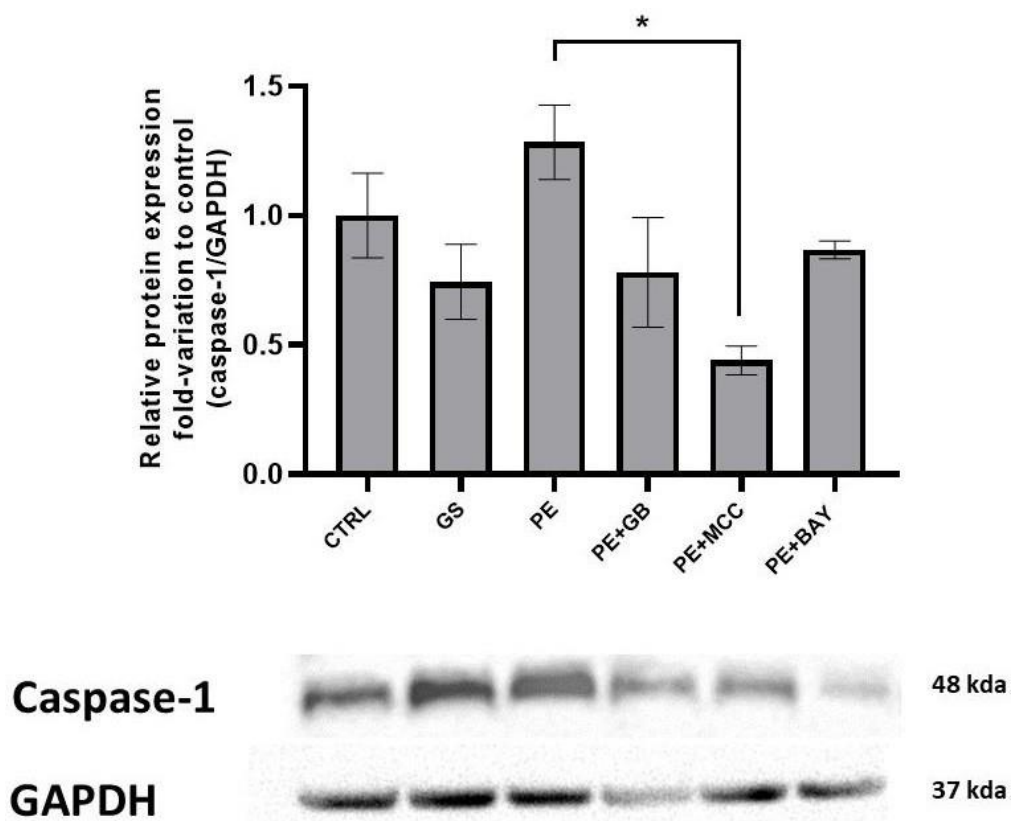


Figura 5. Expressão relativa da caspase-1. A caspase apresenta maior expressão no grupo PE e menor expressão no grupo PE+MCC, apresentando diferença estatística entre os dois grupos. O grupo PE apresenta tendência a ter maior expressão relativa em comparação ao grupo GS e CTRL. Grupos com (*) indicam diferença estatística entre ele com $p < 0,05$.

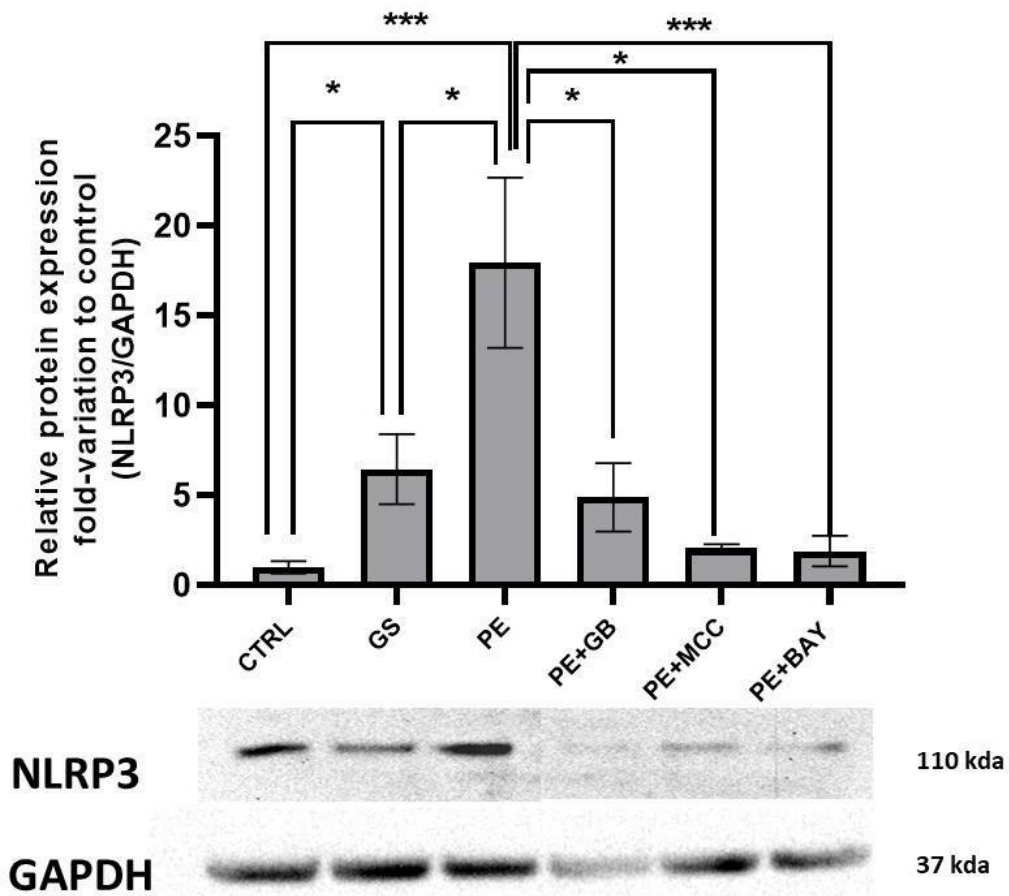


Figura 6. Expressão relativa de NLRP3. A proteína NLRP3 apresenta maior expressão no grupo PE e menor expressão no grupo CTRL, apresentando diferença estatística entre todos os grupos. Os grupos CTRL e PE apresentam diferença estatística maior quando comparada a diferença entre PE e outros grupos, exceto a diferença entre PE e PE+BAY que obteve resposta de mesma significância. Grupos com (*) indicam diferença estatística entre ele com $p < 0,05$ e (***) com $p < 0,001$.

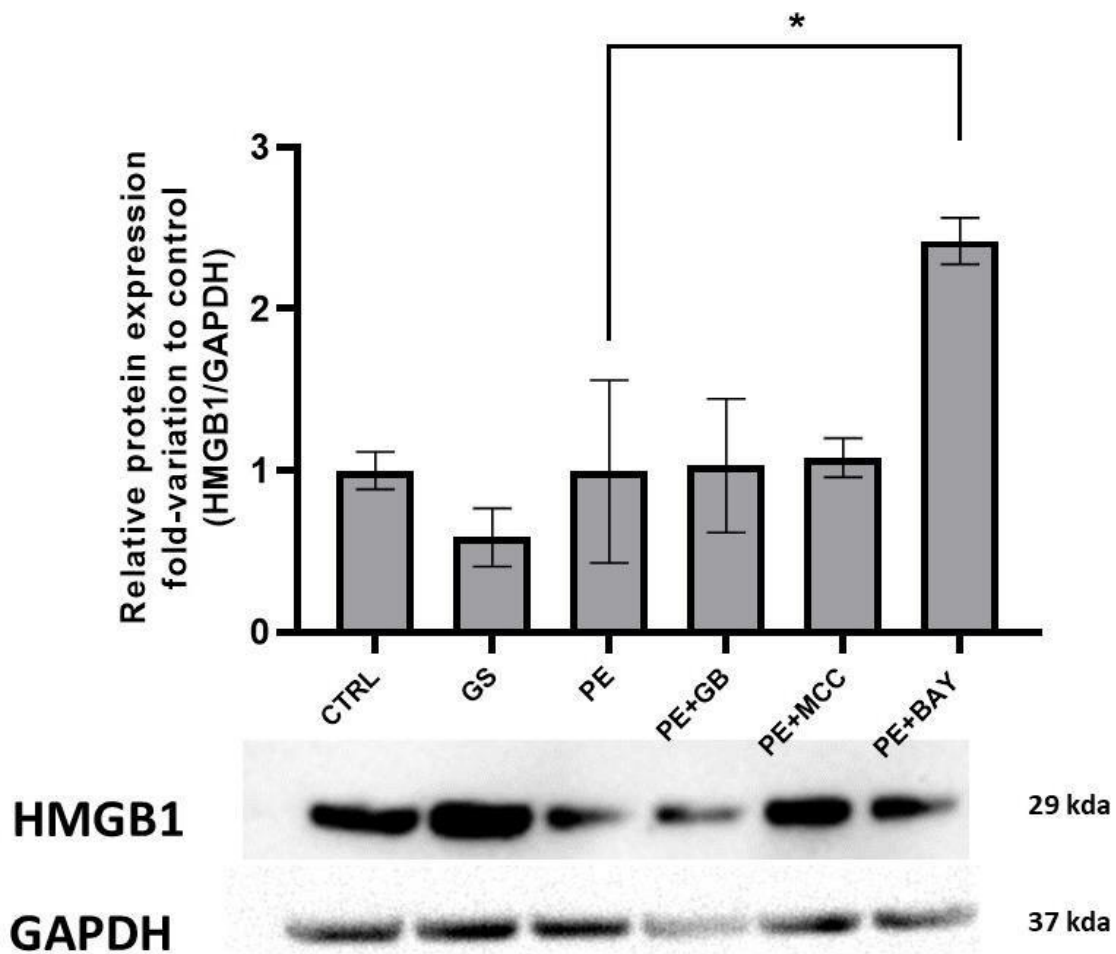


Figura 7. Expressão relativa da HMGB1. A HMGB1 apresenta maior expressão no grupo PE+BAY e menor expressão no grupo PE, apresentando diferença estatística entre os dois grupos. O grupo PE apresenta tendência a ter maior expressão relativa em comparação ao grupo GS. Grupos com (*) indicam diferença estatística entre ele com $p < 0,05$.

3 DISCUSSÃO

A caspase-1 e o NLRP3 fazem parte da estrutura do inflamassoma NLRP3 que é ativado como parte da resposta inflamatória (BAI et al., 2020). Nossos resultados mostram que ambas as proteínas têm maior expressão relativa no grupo de células incubadas somente com plasma de PE, indicando assim que esse grupo apresenta maior tendência a inflamação. Esse resultado é esperado, tendo em vista que a PE é uma doença inflamatória. Quando incubamos as células com as drogas 30 minutos antes de adicionar o pool de plasma, buscamos observar se elas apresentam efeito protetivo em relação ao plasma de PE. É possível observar esse efeito na redução da expressão de proteínas inflamatórias, como no caso da caspase-1 que obteve

diferença estatística com relação aos grupos PE e PE+MCC. A literatura mostra que o MCC950 apresenta potencial inibitório da caspase-1 impedindo sua ação na clivagem das pró-formas de interleucinas (ZAHID et al., 2019). Essa função é observada quando avaliamos que o MCC reduz a expressão da caspase-1, sendo o grupo com menor grau de expressão da proteína e apresentando diferença estatística com o grupo PE, o de maior expressão da proteína.

O NLRP3 obteve diferenças estatísticas em todos os grupos. A proteína faz parte da estrutura do inflamassoma, sendo assim um indicativo da presença de inflamação (SEOK et al., 2021). Nos resultados é possível observar que o grupo com maior expressão da proteína é o grupo PE, indicando maior potencial de inflamação. Quando observamos o efeito das drogas é possível notar que a que obteve a melhor resposta na prevenção da inflamação foi o BAY 11-7821, droga conhecida como um potente inibidor da via NF- κ B (CHEN et al., 2023). Entendendo que essa via culmina na ativação do inflamassoma, quando adicionamos um inibidor, é esperado ver uma redução da inflamação, o que está alinhado com nossos resultados sendo o grupo tratado com BAY, o que obteve menor expressão relativa de NLRP3. Apesar do grupo tratado com BAY ter apresentado maior diferença com relação ao grupo PE, de maior expressão, as outras drogas também apresentaram diferença estatística como no caso da glibenclamida, droga já estudada pelo grupo e que obteve resultados e relação ao aumento de NO, que está intrinsecamente relacionado com a PE, visto que a redução de NO como consequência do aumento de EROs é um dos mediadores de disfunção endotelial, tendo em vista seu papel crucial no relaxamento vascular (SHIHATA et al., 2016).

Com o resultado, podemos ver que a glibenclamida (GB) é uma droga de interessante potencial terapêutico, pois tem papel tanto na redução da expressão de NLRP3 quanto no aumento de NO auxiliando na prevenção da hipertensão (NUNES et al., 2022). Assim como a GB, o MCC também apresentou diferença estatística com relação ao grupo PE, essa droga que atua como inibidor específico no domínio ATPase do NLRP3 impedindo a ativação do inflamassoma e consequentemente a liberação de moléculas pró- inflamatórias (ZAHID et al., 2019). A partir do resultado apresentado é possível dizer que o MCC também apresenta potencial terapêutico tendo em vista seu pontecial de prevenção da expressão da proteína NLRP3. Com relação a diferença estatística entre os grupos CTRL e PE, podemos assumir que isso se dá pelo fato da proteína alvo ser parte da estrutura do complexo que só é ativado em resposta a estímulos inflamatórios, considerando que o grupo GS não apresenta esse estímulo é esperado que ele apresente menor expressão da proteína NLRP3 quando comparado a um grupo que apresenta estímulo, resposta essa obtida e apresentada na expressão relativa de NLRP3. O

mesmo se espera quando comparamos os grupos GS e PE, tendo em vista que o pool de plasma é de gestantes saudáveis, a expressão relativa da proteína deve ser menor do que no plasma de gestantes com PE, como observado na diferença estatística entre os grupos analisados.

O HMGB1 obteve maior expressão no grupo PE+Bay, dados da literatura mostram que o BAY é um importante inibidor da via NF- κ B, uma das vias de ativação do inflamassoma (ZAHID et al., 2019). No gráfico é possível observar que o grupo tratado com o BAY foi o que teve maior expressão de HMGB1, diferente da caspase-1, o fármaco não foi capaz de prevenir a expressão da proteína inflamatória. O HMGB1 é uma proteína que está envolvida no processo de piroptose, sendo uma molécula pró-inflamatória liberada após a ruptura da membrana. A liberação extracelular de HMGB1 pode ser causada por mecanismos não canônicos juntamente com IL-1 β e IL-18, ou pode ser uma consequência passiva da lise celular durante a piroptose. O HMGB1 extracelular pode se ligar aos seus receptores, incluindo *toll-like receptor 2* (TLR2), TLR4 e RAGE, induzindo assim respostas de inflamação e reparo (BAI et al., 2020). Trabalhos anteriores mostram que a piroptose pode ser ativada por outras outras caspases além da caspase-1 presente no inflamassoma (AIZAWA et al., 2020) logo é possível sugerir que ainda que o BAY tenha inibido a via canônica de ativação do inflamassoma, a expressão de HMGB1 continuou ativa, pois foi desencadeada por outras vias da piroptose que liberam a proteína.

4 CONCLUSÃO

A PE é um grande desafio devido a sua complexidade clínica, tornando-se imprescindível compreender diversos fatores que permeiam a síndrome, como sua etiologia, sua fisiopatologia e métodos terapêuticos, a fim de atenuar a hipertensão evitando prejuízos tanto para a mãe quanto para o bebê. Após compreender o envolvimento do inflamassoma, sua via de ativação e seu papel como mediador da inflamação no processo que culmina na disfunção endotelial, é possível adotá-lo como alvo para possíveis abordagens terapêuticas. Além de determinar drogas que tenham papel inibitório em diversos pontos da via impedindo tanto a ativação quanto a formação do complexo. Em resumo, esse estudo foi capaz de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos nas vias de ativação e foi capaz de testar drogas como o MCC950, BAY 11-7821 e glibenclamida como possíveis abordagens terapêuticas após demonstrarem efeito preventivo na expressão de proteínas envolvidas na inflamação abrindo caminho para posteriores estudos a fim de confirmar a eficácia dos tratamentos e aplicá-los na clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, E. et al. GSDME-Dependent Incomplete Pyroptosis Permits Selective IL-1 α Release under Caspase-1 Inhibition. **iScience**, v. 23, n. 5, p. 101070, maio 2020.

BAI, B. et al. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 9, p. 776, 18 set. 2020.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. 1976.

CHEN, J. et al. Inhibition of the NF- κ B Signaling Pathway Alleviates Pyroptosis in Bladder Epithelial Cells and Neurogenic Bladder Fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 11160, 6 jul. 2023.

COLL, R. C. et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 6, p. 556–559, jun. 2019.

DIMITRIADIS, E. et al. Pre-eclampsia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 1, p. 8, 16 fev. 2023.

GEORGE, E. M.; GRANGER, J. P. Mechanisms and Potential Therapies for Preeclampsia. **Current hypertension reports**, v. 13, n. 4, p. 269–275, ago. 2011.

Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, Number 222. **Obstetrics & Gynecology**, v. 135, n. 6, p. e237, jun. 2020.

GUIDA, J. P. D. S. et al. Prevalence of Preeclampsia in Brazil: An Integrative Review. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 44, n. 07, p. 686–691, jul. 2022.

MAGEE, L. A. et al. The 2021 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy classification, diagnosis & management recommendations for international practice. **Pregnancy Hypertension**, v. 27, p. 148–169, mar. 2022.

MOL, B. W. J. et al. Pre-eclampsia. **The Lancet**, v. 387, n. 10022, p. 999–1011, mar. 2016.

NUNES, P. R. et al. Glibenclamide Increases Nitric Oxide Levels and Decreases Oxidative Stress in an In Vitro Model of Preeclampsia. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1620, 20 ago. 2022.

PLACE, D. E.; KANNEGANTI, T.-D. Recent advances in inflammasome biology. **Current Opinion in Immunology**, v. 50, p. 32–38, fev. 2018.

RAI, V.; MATHEWS, G.; AGRAWAL, D. K. Translational and Clinical Significance of DAMPs, PAMPs, and PRRs in Trauma-induced Inflammation. **Archives of clinical and biomedical research**, v. 6, n. 5, p. 673–685, 2022.

SEOK, J. K. et al. Therapeutic regulation of the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 44, n. 1, p. 16–35, jan. 2021.

SHI, J.; GAO, W.; SHAO, F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 245–254, abr. 2017.

SHIHATA, W. A. et al. Caveolae: A Role in Endothelial Inflammation and Mechanotransduction? **Frontiers in Physiology**, v. 7, 20 dez. 2016.

SOCHA, M. W. et al. The NLRP3 Inflammasome Role in the Pathogenesis of Pregnancy Induced Hypertension and Preeclampsia. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1642, 8 jul. 2020.

VIANA-MATTIOLI, S. et al. Missing links in preeclampsia cell model systems of endothelial dysfunction. **Trends in Molecular Medicine**, v. 29, n. 7, p. 541–553, jul. 2023.

ZAHID, A. et al. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2538, 25 out. 2019.

ZHANG, S.; SHI, Y.; DONG, P. USP8 targeted by Mir-874-3p promotes trophoblastic cell invasion by stabilizing the expression of ENaC on trophoblast membrane. **Human Immunology**, p. S0198885923003221, set. 2023.