

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

GEOVANNA CARLA AMARO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO INFLAMASSOMA NLRP3
SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL EM ARTÉRIAS DO CORDÃO UMBILICAL DE GESTANTES COM
PRÉ-ECLÂMPsia**

BOTUCATU - SP

2023

GEOVANNA CARLA AMARO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO INFLAMASSOMA NLRP3
SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL EM ARTÉRIAS DO CORDÃO UMBILICAL DE GESTANTES COM
PRÉ-ECLÂMPSIA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” como parte das exigências para a obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Valeria Cristina Sandrim

BOTUCATU - SP

2023

S586a

Silva, Geovanna Carla Amaro da

Avaliação da inibição farmacológica do inflamassoma NLRP3 sobre a expressão gênica de marcadores de disfunção endotelial em artérias de cordão umbilical de gestantes com pré-eclâmpsia / Geovanna Carla Amaro da Silva. -- Botucatu, 2023
20 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Valeria Cristina Sandrim

1. Gestantes. 2. Cordão umbilical. 3. Pré-eclâmpsia. 4. Glibenclamida. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Eliane Amaro, que em nenhum momento deixou de acreditar na minha capacidade e no meu sonho de estudar em uma universidade pública. Em meio a todas as dificuldades que enfrentamos, agradeço imensamente sua força extraordinária em lutar pela educação de seus filhos. Você é minha maior inspiração.

À minha irmã, Ana Paula, por sempre torcer e me apoiar, mesmo que à distância. Você sempre será uma inspiração de força e de determinação.

Aos meus tios, Maria José e Lincoln Uyezu, que me deram todo o suporte para realizar os vestibulares e continuam me auxiliando até os dias de hoje. Sem a ajuda de vocês eu nunca teria conseguido realizar o meu sonho de me formar em uma universidade pública.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Permanência Estudantil da UNESP, agradeço imensamente pela estrutura fornecida durante todos esses anos, especialmente a ajuda material, que me deu suporte e oportunidade para me dedicar aos meus estudos de maneira integral.

À minha amiga, Luiza Lima, que esteve comigo durante o ano de 2022 e todo este ano desenvolvendo o projeto, me auxiliando a enfrentar todas as adversidades com mais calma e paciência. Obrigada pelo apoio e pelo companheirismo, não só no ambiente acadêmico, mas na vida.

À todos os meus amigos que estiveram comigo nos momentos bons e ruins.

À minha psicóloga, Kauana Barreto, que me acompanhou todos os anos da faculdade e sabe melhor do que ninguém as dificuldades as quais passei. Sua ajuda no meu processo terapêutico foi fundamental para a conclusão dessa etapa da minha vida.

À minha gatinha Liz, minha companheira desde que cheguei em Botucatu, e que esteve e continua comigo em todos os momentos.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, CNPq e FAPESP (Nº do processo: 2023/00933-9), agradeço imensamente o apoio financeiro durante esses dois últimos anos da graduação. Esse apoio foi fundamental para minha manutenção na universidade.

Aos meus colegas de laboratório do Departamento de Biofísica e Farmacologia e à orientadora Valeria Sandrim pelos aprendizados.

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome gestacional humana, sendo uma das principais causas de morte obstétricas diretas no Brasil. Apesar de sua fisiopatologia não estar plenamente elucidada, relaciona-se a PE com a isquemia placentária, visto que a liberação de produtos na circulação materna resultantes da má perfusão pode acarretar uma disfunção endotelial sistêmica. Esses produtos extravasados podem atuar como mediadores inflamatórios e ativar o sistema imune inato, promovendo a intensificação de diversos padrões de sinalizações, os quais atuam sobre o inflamassoma, um complexo proteico que medeia um estado altamente inflamatório, sendo o NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3), o mais bem caracterizado até então. Diante dos desdobramentos sistêmicos provocados pelo processo inflamatório intenso devido à ativação do NLRP3 e considerando que as causas relacionadas à resposta inflamatória e apoptose celular na PE ainda não foram plenamente elucidadas, o uso de fármacos como a glibenclamida (GB) e de abordagens moleculares relacionadas à inibição farmacológica do NLRP3 podem ser uma boa estratégia para futuros tratamentos da PE. A GB é um anti-hiperglicemiante oral da segunda geração de sulfonilureias que vem sendo conhecido por inibir canais de potássio sensíveis à adenosina trifosfato no complexo do inflamassoma, além de impedir a migração e a infiltração de células inflamatórias para o NLRP3. Nesse sentido, visando investigar os efeitos da inibição farmacológica do inflamassoma através da GB em vasos acometidos pela pré-eclâmpsia, artérias de cordões umbilicais de gestantes diagnosticadas com pré-eclâmpsia (PE) e de gestantes normotensas (NT) foram incubadas na presença ou não do fármaco e as expressões gênicas de marcadores de fatores responsáveis pelo processo inflamatório e de piroptose, como *NLRP3*, *CASP3* e *CASP1*, foram comparados nas artérias umbilicais. A disfunção endotelial foi comparada. Foram estudadas 3 gestantes diagnosticadas com PE e 4 gestantes NT que realizaram parto cesáreo no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB). Todas as pacientes envolvidas foram informadas e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (nº 4.961.945 aprovado em 09/09/2021). Os dados do presente estudo sugerem que a GB pode ter efeito na inibição do NLRP3 através da *down-regulation* de fatores relacionados à disfunção endotelial, como NLRP3, caspase-1 e caspase-3. Entretanto, esses dados reforçam a necessidade de mais estudos *ex vivo* com artérias umbilicais humanas e com uma maior amostragem a fim de confirmar os resultados encontrados e desenvolver, posteriormente, um possível tratamento para a pré-eclâmpsia através da utilização da glibenclamida.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1.	Pré-eclâmpsia.....	6
1.2.	Glibenclamida.....	8
1.3.	Justificativa do tema	9
2	METODOLOGIA	9
2.1.	Seleção das participantes e coleta do cordão umbilical de gestantes NT e PE	9
2.2.	Artérias umbilicais e incubação com GB	10
2.3.	Reação de transcrição reversa e PCR em tempo real para análise da expressão gênica de indicadores de resposta inflamatória e de morte celular	10
2.4.	Análise estatística	11
3	RESULTADOS	11
3.1.	Parâmetros clínicos das pacientes NT e PE	11
3.2.	Expressão gênica de indicadores de resposta inflamatória e de morte celular em artérias umbilicais de gestantes NT e de gestantes PE na ausência de GB.....	12
3.3.	Expressão gênica de marcadores de resposta inflamatória e morte celular em artérias umbilicais de gestantes PE e de gestantes PE na presença de GB.....	13
4	DISCUSSÃO	15
5	CONCLUSÃO	16
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16

1 INTRODUÇÃO

1.1. Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome gestacional responsável por 37% das causas de morte obstétricas diretas no Brasil¹ e a principal causa de morbidade e mortalidade entre 2 a 8% das gestações no mundo todo². Seus sintomas clínicos estão associados com uma hipertensão arterial prévia, que ocorre mais frequentemente a partir da 20ª semana de gestação ou nos primeiros dias após o parto, sendo acompanhada ou não por proteinúria, mas intimamente relacionada a complicações sistêmicas, como insuficiência renal, disfunção endotelial e útero-placentária, síndrome HELLP (hemólise, elevação de enzimas hepáticas e trombocitopenia), além da restrição do crescimento fetal^{3,4}.

Em uma gestação normal, durante o segundo trimestre de gravidez, as artérias espiraladas maternas são invadidas pelo trofoblasto e diferenciam-se fenotipicamente em células endoteliais, culminando na remodelação dessas artérias⁵. Este processo é essencial para garantir a vasculogênese, que garantirá um suprimento sanguíneo adequado para a placenta e para o desenvolvimento fetal. No entanto, em placentas de gestantes com PE, a invasão trofoblástica ocorre de maneira inadequada, ocorrendo em torno de 30 a 50% das artérias⁶, o que leva a um quadro de má perfusão e de isquemia placentárias⁷. Somado ao suprimento insuficiente de oxigênio e nutrientes, há a redução da área de superfície disponível para troca materno-fetal, podendo contribuir para os desfechos desfavoráveis relacionados à gestação⁸.

Atualmente, estudos demonstraram⁹ que há forte correlação entre a isquemia placentária e essa síndrome, visto que a liberação de produtos na circulação materna resultantes da má perfusão pode acarretar uma disfunção endotelial sistêmica. Os mecanismos pelos quais estes produtos são liberados na circulação materna, sendo capazes de modificar a função endotelial das gestantes com PE e, conseqüentemente, alterar o balanço entre as substâncias vasoativas, como óxido nítrico (NO), prostaciclina e endotelina, ainda não são totalmente conhecidos¹⁰.

A literatura demonstra que a disfunção endotelial generalizada observada na PE é a principal causa das anormalidades clínicas observadas nesta doença^{11,12}. A disfunção da barreira endotelial é caracterizada pela perda de contato entre as células endoteliais e o extravasamento de plasma, proteínas, células e solutos¹³. Em um processo normal, essas células endoteliais vasculares recobrem a camada interna de vasos sanguíneos, formando uma barreira entre o sangue e a matriz extravascular, o que mantém o transporte de solutos, fluidos e células¹⁴. A liberação de produtos na circulação materna altera o balanço de substâncias significativas para a manutenção da angiogênese adequada ao meio uterino, como óxido nítrico (NO), prostaciclina e endotelina¹⁰. Esses produtos extravasados podem atuar como mediadores

inflamatórios e ativar o sistema imune inato, o primeiro mecanismo pelo qual o organismo responde imediatamente a infecções e injúrias, por meio do reconhecimento por receptores de reconhecimento padrão (pattern recognition receptors - PRRs)¹⁵. Os PRRs reconhecem moléculas liberadas por patógenos ou células danificadas. Tais sinais moleculares são chamados de padrões moleculares associados ao dano (damage-associated molecular pattern - DAMPs) ou à patógenos (pathogen associated molecular pattern - PAMPs)¹⁶. Receptores de reconhecimento padrão (pattern recognition receptors - PRRs) reconhecem moléculas liberadas por patógenos ou células danificadas.

O inflamassoma, complexo proteico que medeia um estado altamente inflamatório, reage à sinalização efetuada por PAMPs e DAMPs e é ativado, sendo o NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3), o melhor caracterizado até então¹⁷. A interação entre PAMPs e DAMPs com os *toll-like receptors* (TLRs) leva a uma ativação da via do NF- κ B (*factor nuclear kappa B*), resultando no aumento da transcrição de NLRP3 e pró-interleucina 1 β (pró-IL-1 β), bem como da proteína ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*)¹⁸. Em um segundo momento, as DAMPs interagem com *nod-like receptors* (NLRs), resultando na oligomerização de NLRP3, ASC e pró-caspase-1¹⁷. Quando ativada, a pró-caspase-1 produz caspase-1 (CASP-1) e sua atividade leva às formas ativas de interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18), que serão secretadas no meio extracelular^{19,20}. A interleucina 1 β (IL-1 β) induz a expressão de genes que controlam febre, dor, vasodilatação e hipotensão, além da indução de resposta celular endotelial que facilita a infiltração de células imunes em tecidos danificados¹⁷. A IL-18 é necessária para a produção de interferon-gama (IFN- γ), uma citocina co-estimulatória que medeia a imunidade adaptativa²¹. Além disso, a ativação da CASP-1 também cliva a gasdermina D (GSDMD), a qual promove a formação de poros nas membranas celulares e desencadeia uma forma lítica e pró-inflamatória de morte celular, denominada piroptose. Achados na literatura indicam que a gasdermina E (GSDME/DFNA5) foi encontrada expressa em artérias³¹. A clivagem da GSDME pela CASP-3 libera o domínio N-GSDME, que também medeia a piroptose através da formação de poros nas membranas celulares. Esse processo de morte celular programada gera espécies altamente inflamatórias, além de um excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem aumentar o catabolismo do NO, diminuindo sua biodisponibilidade²².

O NLRP3 também pode ser ativado por outros variados estímulos, incluindo ATP e ionóforos de K⁺²³. Demonstrou-se que a depleção citosólica de K⁺ medeia a maturação e a liberação de IL-1 β por macrófagos e monócitos em resposta ao ATP^{24,25,26}. Além disso, apenas

a diminuição de K^+ intracelular demonstrou-se capaz de ativar NLRP3, tanto na via não canônica medida por caspase-11 quanto na via alternativa^{27,28} (Figura 1).

Nesse sentido, a ativação do NLRP3 é considerada um fator agravante da disfunção endotelial existente na pré-eclâmpsia e relaciona-se com diversos desdobramentos da doença, como a inflamação e a morte celular por piroptose, processos relacionados à fisiopatologia da PE.

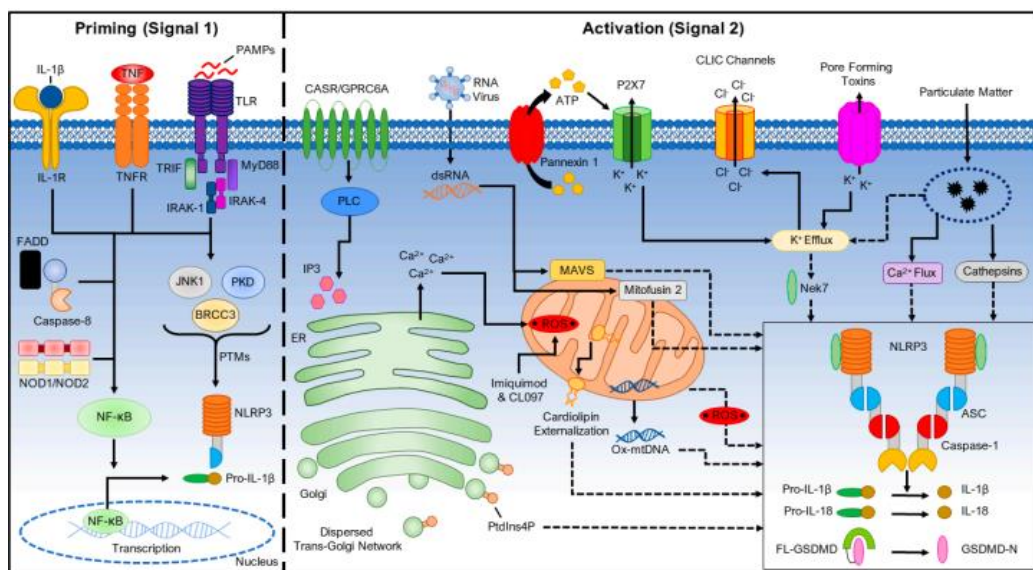


Figura 1. Mecanismos das duas vias de ativação do inflamassoma NLRP3. A primeira via, (signal 1, esquerda), leva à ativação da via do NF- κ B resultando no aumento da transcrição de NLRP3 e pró-IL-1 β bem como da proteína ASC. A segunda via (signal 2, direita) ocorre por meio de variados estímulos, incluindo ATP extracelular, fluxo iônico, disfunção mitocondrial e EROs. Kelley et al. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 3328.

1.2. Glibenclamida

Um dos fármacos atualmente testados para inibir farmacologicamente o inflamassoma NLRP3 é a glibenclamida (GB), uma droga da família das sulfonilureias amplamente prescrita para tratar Diabetes Mellitus tipo 2²⁹. Sua ação farmacológica foi descrita³⁰ em 2019, sendo conhecida por impedir a migração e a infiltração de células inflamatórias para o NLRP3 através da indução do fechamento dos canais de potássio sensíveis a adenosina trifosfato (ATP) e do aumento da concentração intracelular de K^+ ³⁰. Este fármaco age melhorando a disfunção endotelial das artérias e veias umbilicais e já foi descrito como inibidor de NLRP3 em células endoteliais na barreira hemato-encefálica²⁹. Esses canais também estão presentes no músculo liso e sua abertura leva ao relaxamento vascular^{29,30}. Visto isso, considerando que as causas relacionadas à disfunção endotelial na PE ainda não foram plenamente elucidadas, a análise da expressão gênica de fatores responsáveis pelo processo inflamatório e de piroptose nas artérias

umbilicais sob a ação de fármacos como a glibenclamida, pode ser uma boa estratégia para uma melhor compreensão dessa doença e para propor tratamentos com fármacos que ajam nessa via inflamatória, futuramente.

1.3. Justificativa do tema

Estudos com artérias umbilicais humanas são escassos na literatura, embora seja um material importante para o entendimento da fisiopatologia da PE. Nesse sentido, o intuito do presente estudo foi corroborar com outros achados do laboratório em modelos *ex vivo*, no qual foram realizados ensaios de reatividade vascular em artérias umbilicais de gestantes PE e de gestantes NT. O presente estudo propôs um tratamento farmacológico para a inibição do inflamassoma NLRP3 por meio da glibenclamida, um fármaco já conhecido na literatura por aumentar a concentração intracelular de K^+ , inativando o NLRP3, além da análise da expressão gênica de fatores ligados à disfunção endotelial, como inflamação e morte celular por piroptose.

2 METODOLOGIA

2.1. Seleção das participantes e coleta do cordão umbilical de gestantes NT e PE

Foram estudadas 3 gestantes portadoras de pré-eclâmpsia (PE) com sinais de gravidade que realizaram a assistência ao parto cesáreo na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e 4 gestantes normotensas (NT) que realizaram a assistência ao parto cesáreo no Hospital Estadual de Botucatu (HEB). A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e confirmada por exame ultrassonográfico precoce (menos que 12 semanas de gestação).

Critérios de inclusão: Gestantes com pré-eclâmpsia - com idade gestacional entre 24 e 40 semanas, com diagnóstico de pré-eclâmpsia com sinais de gravidade e não apresentar qualquer outra patologia clínica ou obstétrica. Gestantes normotensas – com idade gestacional entre 24 e 40 semanas, não ter diagnóstico de pré-eclâmpsia e não apresentar patologias clínicas ou obstétricas.

Critérios de não-inclusão: apresentação de qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, tais como: gestação gemelar, doenças renais, doenças infecciosas, má-formação fetal, soro positividade para vírus da imunodeficiência humana - HIV e uso de drogas e álcool. Todas as mulheres envolvidas no estudo 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 aprovado em 09/09/2021).

2.2. Artérias umbilicais e incubação com GB

Aproximadamente 15 a 30 minutos após a realização do parto, fragmentos de 10 mg (aproximadamente 1 cm de comprimento) foram seccionados do cordão umbilical de gestantes NT (n = 4) e de gestantes com PE (n = 3). Os tecidos adiposo e conectivo foram removidos cirurgicamente das artérias umbilicais das gestantes com PE, sendo posteriormente seccionadas em duas partes: uma parte foi incubada na presença de 0,0050 mg/mL de GB e a outra sem o fármaco; ambas foram incubadas à 37 °C por 15 minutos. As artérias umbilicais da gestante NT passaram pelo mesmo processo de remoção dos tecidos adiposo e conectivo e foram incubadas na ausência de GB nas mesmas condições experimentais das amostras PE.

2.3. Reação de transcrição reversa e PCR em tempo real para análise da expressão gênica de indicadores de resposta inflamatória e de morte celular

Para a realização da RT-qPCR, o RNA total das artérias umbilicais previamente tratadas e não tratadas com glibenclamida de gestantes NT e de gestantes PE foi extraído. Inicialmente, foi realizada a síntese de cDNA a partir das amostras de RNA total utilizando o kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Fisher, cat. K1671), seguindo as instruções do fabricante. Os experimentos de qPCR foram realizados em duplicata, com ausência de cDNA no *no target control* (NTC) e usando o termociclador QuantStudio 3 TM (Applied Biosystems). Para os ensaios de expressão relativa, foi utilizado o Kit Luna SYBR Green Master Mix Universal (New England Biolabs, cat. M300L) seguindo o protocolo do fabricante. Em cada reação foi utilizado 8 µL Luna Universal qPCR, 100 nM de cada primer (forward e reverse), 2 µL de cDNA (2.5 ng/µL) e quantidades variadas de água nuclease-free para completar o volume final de 10 µL de cada reação. Os seguintes genes foram analisados: *CASP1*, *CASP3*, *NLRP3* e *β-actina*. A média geométrica do *β-actina* foi escolhida como referência devido à sua estabilidade nas amostras. Os cDNAs foram amplificados nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C/1 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C/15s, e anelamento/extensão a 60°C/1 min. A análise do ensaio foi realizada pelo GeneGlobe Data Analysis Center (QIAGEN 2013–2022) em amostras em duplicata.

2.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no GeneGlobe Data Analysis Center (QIAGEN 2013–2022) em amostras em duplicata. O cálculo do valor de p foi baseado no teste t-Student referente aos valores do $2^{-\Delta\Delta CT}$ das replicatas de cada gene do grupo controle e dos grupos tratados. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo e seu cálculo baseou-se na distribuição paramétrica não pareada.

3 RESULTADOS

3.1. Parâmetros clínicos das pacientes NT e PE

Os parâmetros clínicos das pacientes cujos cordões umbilicais foram coletados para o ensaio de expressão gênica estão representados na Tabela 1. Não foram identificadas diferenças estatísticas no parâmetro de idade materna, IMC, peso do recém-nascido e índice APGAR entre os grupos. As gestantes também apresentaram parâmetros similares em relação à raça, primiparidade e tabagismo. Em contrapartida, a pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) está aumentada no grupo PE quando comparada com o grupo NT (ambos $p < 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros clínicos das pacientes

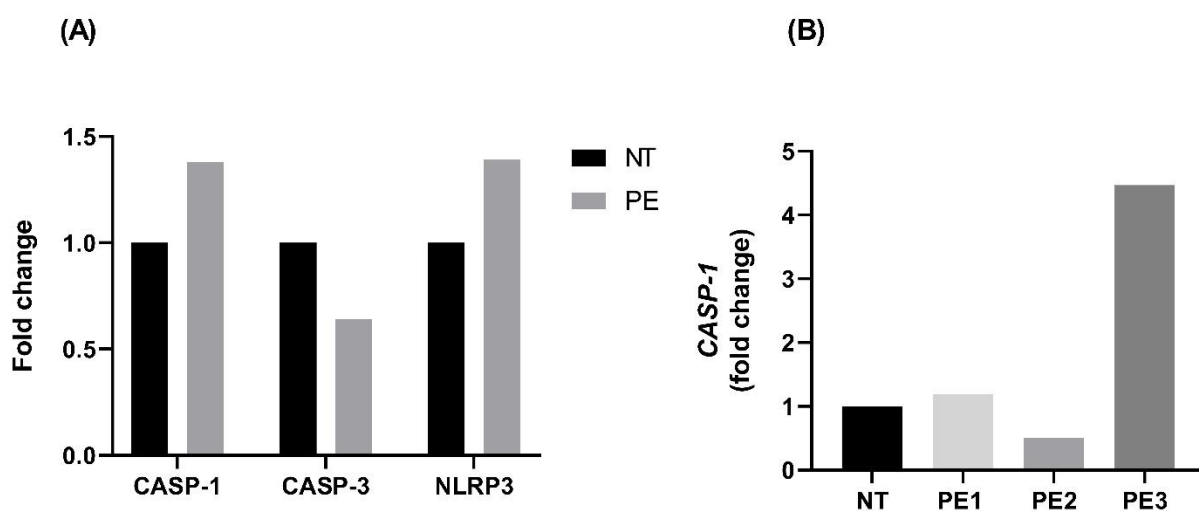
Parâmetros	Gestantes Normotensas	Pré-eclâmpsia	p
N	4	3	
Idade (anos)	25,25 ± 2,175	31 ± 1,528	0,1018
Caucasianas (%)	100	66,66	0,7952
Primiparas (%)	50	0	0,7952
Tabagistas (%)	0	0	-
GAS (semanas)	52 ± 12,68	37 ± 1,115	0,1429
PAS (mmHg)	125 ± 2,887	150 ± 10	0,0286*
PAD (mmHg)	80 ± 0	93,33 ± 3,333	0,0286*
Ácido úrico (mg/dL)	ND	5,1 ± 0,8505	-
Hematócrito (%)	ND	38,13 ± 2,634	-
Hemoglobina (g/dL)	ND	12,67 ± 0,8686	-
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	ND	228 ± 15,72	-
Creatinina (mg/dL)	ND	0,73 ± 0,20	-
IMC (kg/m^2)	28,6 ± 3,261	33,18 ± 3,071	0,2286
Peso recém-nascido (g)	3371 ± 225,4	3042 ± 577,4	>0,9999

GAS: idade gestacional na amostragem; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; IMC: índice de massa corpórea; ND: não determinado. Valores representados por média ± erro padrão e frequência (percentual) para variáveis categóricas. As variáveis paramétricas foram comparadas pelo teste t-Student e as não-paramétricas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram comparadas por meio de tabela de contingência. * $p < 0,05$.

3.2. Expressão gênica de indicadores de resposta inflamatória e de morte celular em artérias umbilicais de gestantes NT e de gestantes PE na ausência de GB

Em relação à expressão gênica de *CASP1* e *NLRP3*, houve uma tendência de *up-regulation* (fold change > 1) das amostras PE (n = 3) em relação às amostras NT (n = 4), enquanto que em relação à *CASP3*, houve uma tendência de *down-regulation* (fold change < 1) das amostras PE quando comparadas às NT (Figura 2A). Entretanto, não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

A expressão gênica individual de cada amostra PE quando comparado com NT mostrou um perfil variado. Em relação à expressão gênica de *CASP1*, os grupos PE1 e PE3 tenderam ao *up-regulation* enquanto PE2 tendeu ao *down-regulation* (Figura 2B). Na expressão gênica de *CASP3*, os grupos PE2 e PE3 apresentaram uma tendência de *down-regulation*, enquanto o grupo PE1 demonstrou uma tendência de *up-regulation* (Figura 2C). Por fim, a expressão gênica de *NLRP3* nos grupos PE2 e PE3 demonstraram uma tendência de *down-regulation* enquanto no PE1 demonstrou uma tendência de *up-regulation* (Figura 2D), no entanto não houve diferença estatística ($p > 0,05$).



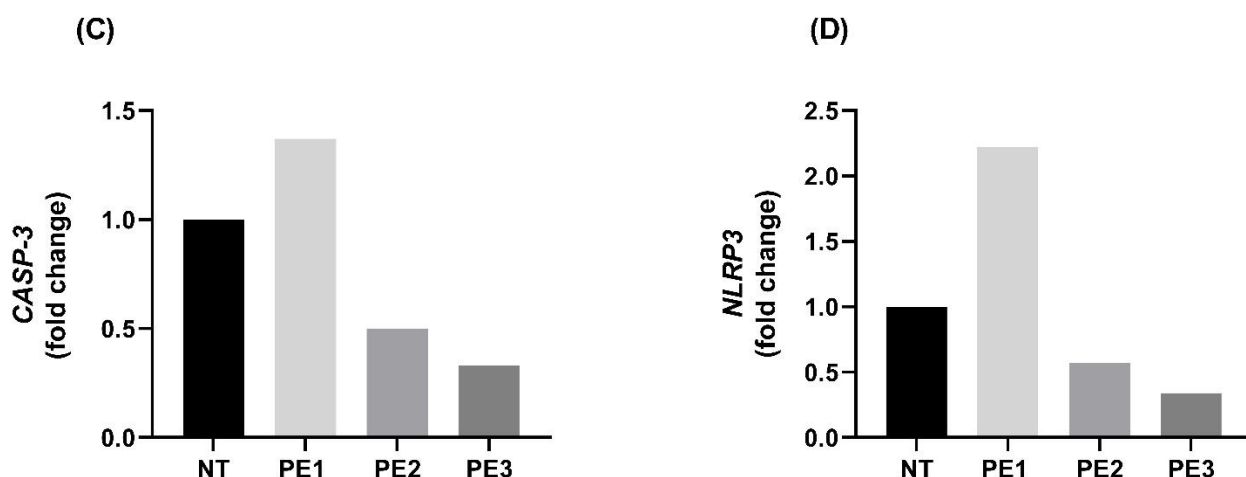


Figura 2. Expressão gênica relativa (fold change) de *CASP1*, *CASP3* e *NLRP3* em artérias de gestantes NT (n = 4) e de gestantes PE (n = 3) (A), seguida da expressão gênica independente de cada amostra PE individual comparada com NT (B-D). Valores estão representados como expressão gênica relativa (fold change). Expressão gênica relativa = 1 representa NT (controle), $p < 0,05$.

3.3. Expressão gênica de marcadores de resposta inflamatória e morte celular em artérias umbilicais de gestantes PE e de gestantes PE na presença de GB

A expressão gênica de cada amostra PE não tratada foi comparada à sua amostra correspondente tratada com GB. Em relação à *CASP1*, todas as amostras tratadas com GB tenderam ao *down-regulation* em relação às suas amostras PE não tratadas (Figura 3A). Em relação à *CASP3*, houve um perfil variado, com as amostras PE2 e PE3 tratadas com GB tendendo ao *up-regulation* em relação às suas amostras PE controle, enquanto PE1 + GB apresentou uma expressão gênica menor em relação a sua amostra controle (Figura 3B). Na expressão gênica de *NLRP3*, também se observaram tendências variadas, com as amostras PE1 + GB e PE2 + GB apresentando uma tendência de *down-regulation* em relação ao controle, enquanto a amostra PE3 + GB apresentou uma tendência de *up-regulation* em relação a sua amostra controle PE3 (Figura 3C). Novamente, não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

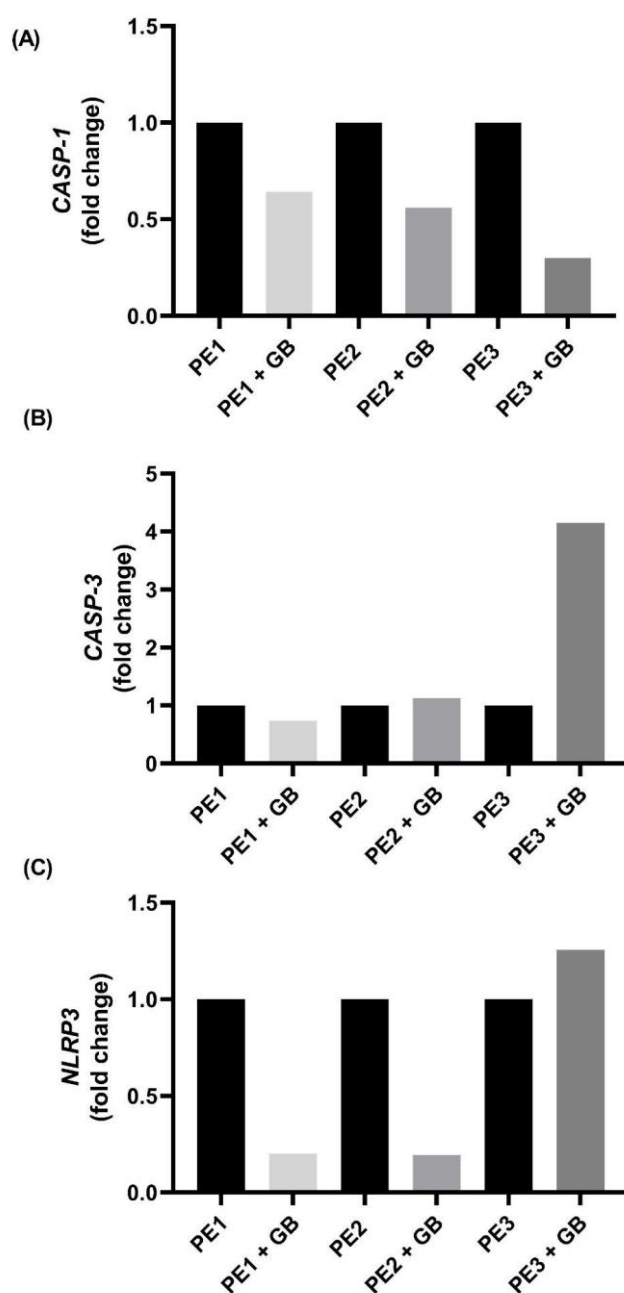


Figura 3. Expressão gênica relativa (fold change) independente de *CASP1*, *CASP3* e *NLRP3* em artérias de cada amostra individual de gestantes PE + GB (n = 3) comparadas com o controle correspondente. Valores estão representados como expressão gênica relativa (fold change). Expressão gênica relativa = 1 representa PE (controle), $p < 0,05$.

4 DISCUSSÃO

O inflamassoma é um complexo proteico que medeia a resposta imune inata via ativação da caspase-1 (CASP-1) e caspase-3 (CASP-3), promovendo a secreção de fatores como IL-1 β and IL-18, relacionados ao quadro altamente inflamatório caracterizado pela ativação deste complexo. Estudos *in vivo* e *ex vivo*^{36,37} demonstraram que a ativação do inflamassoma NLRP3 está envolvida na patogênese da PE e de outras síndromes da gravidez relacionadas à inflamação placentária, como disfunção endotelial e morte celular por piroptose, sugerindo que a inibição do NLRP3 ou de seus mediadores pode promover o desenvolvimento de novas terapias anti-inflamatórias para a prevenção ou para o tratamento dessas síndromes, principalmente na PE. Visto isso, para a melhor compreensão da fisiopatologia da PE e para investigação de possíveis tratamentos que levem em consideração a inibição do NLRP3, o presente estudo utilizou um modelo *ex vivo* para realizar os experimentos.

Os parâmetros clínicos das pacientes cujas amostras de artérias umbilicais foram coletadas para este estudo foram avaliados a fim de identificar possíveis fatores que indicassem diferenças entre o grupo PE e o grupo NT. A avaliação desses parâmetros demonstrou que a pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) está aumentada no grupo PE quando comparada com o grupo NT (ambos $p < 0,05$), corroborando com a fisiopatologia já descrita desta síndrome, na qual a pressão arterial encontra-se elevada e promove diversos desdobramentos nocivos para a saúde materna.

Apesar de escassos, artigos recentes^{32,33} demonstraram níveis superiores de expressão gênica de *NLRP3* e *CASP1* em tecidos placentários de gestantes pré-eclâmpticas quando comparadas a gestantes normotensas. Outros estudos^{34,35} demonstraram a expressão elevada de *CASP3* em tecidos placentários, mais especificamente no trofoblasto, sugerindo que o aumento da expressão gênica deste biomarcador parece estar relacionado com a diminuição da defesa contra apoptose. Visto isso, o presente estudo utilizou um modelo *ex vivo* para avaliar a inibição farmacológica do NLRP3 e corroborou com a literatura já existente ao observar uma tendência de *up-regulation* (fold change > 1) das amostras PE (n = 3) em relação às amostras NT (n = 4) na expressão gênica de *CASP1* e *NLRP3*. A expressão gênica de *CASP3* nas amostras PE em relação as amostras NT foi menor, divergindo dos dados já publicados.

Para o tratamento/gerenciamento dessa síndrome, o presente trabalho focou na inibição do NLRP3 em artérias umbilicais humanas de gestantes pré-eclâmpticas através da glibenclamida (GB), um fármaco já conhecido na literatura³⁰ por induzir o fechamento de canais de potássio sensíveis a adenosina trifosfato (ATP), aumentando a concentração intracelular de K⁺ na célula e inativando o inflamassoma. A expressão gênica de cada amostra individual PE

não tratada foi comparada a amostra correspondente tratada com GB e observou-se que, em relação à *CASP1*, todas as amostras tratadas tenderam ao *down-regulation* em relação às suas amostras PE não tratadas, o que corrobora com o papel da GB na inibição da ativação do NLRP3 por meio da diminuição de *CASP1*. Na expressão gênica *NLRP3* e de *CASP3*, as tendências mostraram-se mais variadas, embora a maioria das amostras tenham demonstrado uma propensão ao *down-regulation* nas amostras PE tratadas com GB em relação a suas respectivas amostras não tratadas.

5 CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo sugerem que a glibenclamida pode ter efeito na inibição do inflamassoma NLRP3 através do *down-regulation* de fatores relacionados à disfunção endotelial, como NLRP3, caspase-1 e caspase-3. Entretanto, esses dados reforçam a necessidade de mais estudos *ex vivo* com artérias umbilicais humanas e com uma maior amostragem para confirmação desses resultados e para um posterior desenvolvimento de um tratamento para a pré-eclâmpsia utilizando estratégias para a inibição farmacológica do NLRP3.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Laurenti R, Jorge MHPM, Gotlieb SLD. Deaths due to infectious diseases in women: occurrences in pregnancy and puerperium. Rev Assoc Med Bras. 2009;55(1):64-69.
2. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin number 222. Gestational Hypertension and Preeclampsia. Obstetrics & Gynecology. 2020;135(6) 237-260.
3. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. Pregnancy Hypertens. 2014;4:97-104.
4. Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Preeclampsia. Lancet. 2016; pii:S0140-6736:70-77.
5. Collins SL, Birks JS, Stevenson GN, Papageorgiou AT, Noble JA, Impey L. Measurement of spiral artery jets: general principles and differences observed in small-for-gestational-age pregnancies. Ultrasound Obstet. Gynecol. 2012;40:171-178.

6. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of Preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22(2):143-148.
7. George EM, Granger JP. Mechanisms and potential therapies for preeclampsia. *Curr Hypertens Rep*. 2011;13:269-275.
8. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development*. 2019;27;146(22).
9. Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, Moffett A. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *BMJ*. 2019;366.
10. Roberts J. Endothelial Dysfunction in Preeclampsia. *Semin Reprod Med*. 1998;16(01):5-15.
11. Brennan LJ, Morton JS, Davidge ST. Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *Microcirculation*. 2014;21(1):4-14.
12. Goulopoulou S, Davidge ST. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. *Trends Mol Med*. 2015;21(2):88-97.
13. Radeva MY, Waschke J. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol*. 2018;222:e12860.
14. Komarova YA, Kruse K, Mehta D, Malik AB. Protein interactions at endothelial junctions and signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Circulation Res*. 2017;120(1):179-206.
15. Stutz A, Kolbe CC, Stahl R, Horvath GL, Franklin BS, van Ray OE. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J Exp Med*. 2017;214: 1725-1736.
16. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol*. 2020;20: 95–112.
17. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*. 2019;20:3328.
18. Stutz A, Kolbe CC, Stahl R, Horvath GL, Franklin BS, van Ray OE. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J Exp Med*. 2017;214: 1725-1736.
19. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140: 821-832.
20. Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2016;13:148-159.
21. Dinarello, C.A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol*. 2009, 27, 519–550.

22. Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine*.2014;69:136–145.
23. Mariathasan, S.; Weiss, D.S.; Newton, K.; McBride, J.; O'Rourke, K.; Roose-Girma, M.; Lee, W.P.; Weinrauch, Y.; Monack, D.M.; Dixit, V.M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006, 440, 228–232.
24. Perregaux, D.; Gabel, C.A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 15195–15203.
25. Walev, I.; Klein, J.; Husmann, M.; Valeva, A.; Strauch, S.; Wirtz, H.; Weichel, O.; Bhakdi, S. Potassium Regulates IL-1 β Processing Via Calcium-Independent Phospholipase A2. *J. Immunol.* 2000, 164, 5120–5124.
26. Walev, I.; Reske, K.; Palmer, M.; Valeva, A.; Bhakdi, S. Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J.* 1995, 14, 1607–1614.
27. Muñoz-Planillo, R.; Kuffa, P.; Martínez-Colón, G.; Smith, B.L.; Rajendiran, T.M.; Núñez, G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 2013, 38, 1142–1153.
28. Pétrilli, V.; Papin, S.; Dostert, C.; Mayor, A.; Martinon, F.; Tschopp, J. Activation of the NLRP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* 2007, 14, 1583–1589.
29. Xu F, Shen G, Su Z, He Z, Yuan L. Glibenclamide ameliorates the disrupted blood-brain barrier in experimental intracerebral hemorrhage by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome. *Brain Behav.* 2019;9:e01254.
30. Zahid A, Li B, Kombe AJ, Jin T, Tao J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol.* 2019; doi.org/10.3389/fimmu.2019.02538.
31. Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2020;**20**:143–57.
32. Stødle GS, Silva GB, Tangerås LH, Gierman LM, Nervik I, Dahlberg UE, Sun C, Aune MH, Thomsen LCV, Bjørge L, Iversen AC. Placental inflammation in pre-eclampsia by Nod-like receptor protein (NLRP)3 inflammasome activation in trophoblasts. *Clin Exp Immunol.* 2018 Jul;193(1):84-94. doi: 10.1111/cei.13130. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29683202; PMCID: PMC6038006.
33. C Weel I, Romão-Veiga M, Matias ML, Fioratti EG, Peraçoli JC, Borges VT, Araujo JP Jr, Peraçoli MT. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from

- pregnant women with severe preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2017 Sep;123:40-47. doi: 10.1016/j.jri.2017.09.002. Epub 2017 Sep 6. PMID: 28915449.
34. Kadyrov M, Kaufmann P, Huppertz B (2001) Expression of a cytokeratin 18 neo-epitope is a specific marker for trophoblast apoptosis in human placenta. *Placenta* 22: 44–48.
 35. Sharp, A.N.; Heazell, A.E.P.; Baczyk, D.; Dunk, C.E.; Lacey, H.A.; Jones, C.J.P.; Perkins, J.E.; Kingdom, J.C.P.; Baker, P.N.; Crocker, I.P. Preeclampsia is associated with alterations in the p53-pathway in villous trophoblast. *PLoS ONE* 2014, 9, e87621.
 36. Gomez-Lopez N, Motomura K, Miller D, Garcia-Flores V, Galaz J, Romero R. Inflammasomes: Their Role in Normal and Complicated Pregnancies. *J Immunol*. 2019 Dec 1;203(11):2757-2769. doi: 10.4049/jimmunol.1900901. PMID: 31740550; PMCID: PMC6871659.
 37. Boisramé-Helms J, Meziani F, Sananès N, Boisramé T, Langer B, Schneider F, Ragot T, Andriantsitohaina R, Tesse A. Detrimental arterial inflammatory effect of microparticles circulating in preeclamptic women: ex vivo evaluation in human arteries. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015 Oct;29(5):450-61. doi: 10.1111/fcp.12136. Epub 2015 Aug 24. PMID: 26213341.