



Análise da expressão proteica do inflamossomo *NLRP3* em pacientes com evento cardiológico e síndrome metabólica

Eduardo Aires de Oliveira¹, Prof. Dr. Luiz Carlos Bodanese² (orientador)

Faculdade de Medicina, PUCRS

Resumo

Introdução: O *NLRP3* é um complexo proteico o qual faz parte de uma subfamília dos receptores de reconhecimento padrão, moléculas imunológicas responsáveis pelo reconhecimento de padrões de antígenos e posterior ação na ativação e mediação de respostas imunes, através de interações com fatores de transcrição (NF- κ B) e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e a IL-18. Recentemente, estudos com o *NLRP3* o tem associado com doenças como diabetes *mellitus* do tipo 2 e doenças cardíacas. No entanto, ainda há uma série de particularidades chaves do inflamossomo *NLRP3* que permanecem desconhecidas, assim como suas co-relações com as desordens metabólicas.

Objetivo do trabalho: o presente estudo tem como objetivo geral avaliar a expressão proteica do inflamossomo *NLRP3* em grupos de pacientes com diagnóstico de síndrome metabólica com e sem eventos cardiovasculares. Tem também, como objetivos específicos, avaliar as variáveis metabólicas para aterosclerose dos pacientes diagnosticados com síndrome metabólica; dosar a interleucina pró-fibrogênica (TGF- β) do plasma dos pacientes e estudo; e relacionar a expressão proteica dos inflamossomos *NLRP3* com a ativação da caspase-1, a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-18 (IL-18).

Descrição: o presente estudo caracteriza-se por uma pesquisa observacional do tipo transversal controlado com abordagem descritivo-analítica. A população alvo que participará da aplicação deste estudo será originária do ambulatório de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) do Serviço de Cardiologia do Hospital São Lucas da PUCRS (HSL/PUCRS). A amostra a ser estudada será dividida em três grupos, e distribuídos da seguinte forma: grupo 1 (G1) será composto por pacientes diagnosticados com síndrome metabólica (SM) e com evento cardiológico; grupo 2 (G2) por pacientes com o mesmo diagnóstico, porém sem

eventos cardiológicos; e grupo 3 (G3) o qual será utilizado como grupo controle e composto por indivíduos que não apresentam diagnóstico de SM e/ou eventos. Serão considerados como critérios de inclusão: pacientes de ambos os sexos, com idades a partir de 18 anos, com diagnóstico de SM, com e sem evento cardiovascular, possuindo variáveis metabólicas com alterações (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos, pressão arterial, índice de massa corporal (IMC), circunferência da cintura (CC), glicemia de jejum) e que aceitem participar do estudo via assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Como critérios de exclusão: pacientes com idade abaixo de 18 anos e com outros diagnósticos além dos caracterizados nos critérios de inclusão ou que não assinarem o TCLE.

Métodos:

a) seleção da população amostral: a seleção dos pacientes será realizada no Ambulatório de HAS do HSL/PUCRS, através do banco de dados de pacientes cadastrados;

b) coleta das amostras: a coleta de amostras dos pacientes selecionados será efetuada através de punção venosa de 10 mL de sangue com EDTA e 10 mL de sangue sem anticoagulante;

c) procedimentos laboratoriais: após a coleta das amostras, os procedimentos serão feitos no Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação da PUCRS e estão divididos em avaliação bioquímica (c.1), separação da preparação das células mononucleares de sangue periférico (PMBC) (c.2), avaliação da apoptose a autofagia (c.3) e avaliação da expressão de proteínas (c.4), os quais serão descritos a seguir:

c.1) avaliação bioquímica: as dosagens séricas de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos, glicemia e proteína C reativa serão realizadas com kits colorimétricos da marca Labtest.

c.2) Separação da preparação das células mononucleares de sangue periférico (PMBC): os PMBCs serão isolados de sangue humano através do gradiente de centrifugação. Serão utilizados 20 mL de sangue heparinizados, diluídos em 1:2 com Hank's balanceado em solução salina. Esta mistura será de 3 mL de *Lymphoprep* e centrifugado em 400 x g em temperatura ambiente, por 30 minutos. Os PMBCs, incluindo os linfócitos T, serão coletados da superfície com pipeta esterilizada, transferidos e lavados duas vezes em Hank's balanceado em solução salina. As células serão então suspensas em RPMI 1640 suplementada com 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 5% de soro humano, com uma concentração final de 1.6×10^5 célula/mL. A contaminação destas preparações com plaquetas

deve ser $< 1\%$. A viabilidade celular avaliada pelo corante *trypan blue* não deve ser menor do que $\geq 99\%$.

c.3) avaliação da apoptose e autofagia: a apoptose será avaliada através da expressão da caspase-3 e clivagem da PARP. Estas análises serão realizadas pelo método de Western Blot. Para a apoptose também serão utilizados os métodos de Annexin 5 e mitoscreen através da citometria de fluxo.

c.4) avaliação da expressão de proteínas: a avaliação da expressão de proteínas envolvidas com o inflamossomo *NLRP3*, ativação da caspase-1, IL-1 β e IL-18 serão realizadas pelo método de Western Blot e por citometria de fluxo.

d) análise estatística: os resultados serão apresentados através das distribuições absoluta (n) e relativa (%), bem como através das medidas de tendência central (média e mediana) e de variabilidade (desvio padrão, amplitude interquartil), sendo que a simetria das distribuições será investigada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a análise dos dados contínuos será utilizado o teste de análise de variância (ANOVA one way) e o *Post Hoc de Tukey*. Caso a distribuição dos dados não seja aproximadamente normal será utilizado o teste de Kruskal Wallis *Post Hoc de Dunn*. Para avaliar a relação de linearidade intra grupos serão utilizados os coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman. Na análise entre grupos sobre as variáveis categóricas será utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson. Para critérios de decisão estatística será assumido o nível de significância de 5%. Os dados serão analisados com o auxílio do programa SPSS, versão 19.0.

Resultados esperados: as co-relações do inflamossomo *NLRP3* com as desordens metabólicas ainda são desconhecidas. Com isso, espera-se conhecer e descrever as atividades realizadas por este complexo e sua relação com a síndrome metabólica, bem como possíveis novas rotas metabólicas.

Resultados obtidos: neste momento o trabalho encontra-se em fase de realização de procedimento laboratoriais, especificamente na fase de separação da preparação das células mononucleares de sangue periférico (PMBC). Temos, até o momento, 64 amostras coletadas de pacientes. Após coletadas as 150 amostras necessárias, partiremos para as etapas seguintes. Deste modo, o estudo ainda não possui nenhum resultado preliminar.

Palavras-chave

Inflamossomo; *NLRP3*; síndrome metabólica; eventos cardiológicos.