

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema**

**Avaliação do Perfil de Expressão do Receptor da Vitamina D (*VDR*)  
frente à Resposta Inflamatória e Progressão da Placa  
Aterosclerótica**

**Recife  
2018**

**Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema**

**Avaliação do Perfil de Expressão do Receptor da Vitamina D (*VDR*) frente à Resposta Inflamatória e Progressão da Placa Aterosclerótica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração em Biologia Molecular, da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jaqueline de Azevêdo Silva

**Recife  
2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**

Borborema, Maria Eduarda Bezerra de

Avaliação do perfil de expressão do receptor da vitamina D (VDR) frente à resposta inflamatória e progressão de placa aterosclerótica / Maria Eduarda Bezerra de Borborema. – 2018.

78 f. : il.

Orientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2018. Inclui referências e anexos.

1. Aterosclerose 2. Sistema cardiovascular – Doenças 3. Vitaminas I. Silva, Jaqueline de Azevêdo (orientadora) II. Título.

616.136

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 156

**Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema**

**Avaliação do Perfil de Expressão do Receptor da Vitamina D (VDR) frente à Resposta Inflamatória e Progressão da Placa Aterosclerótica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração em Biologia Molecular, da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovada em 27/02/2018

**Comissão Examinadora**

---

**Dr. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

---

**Dr.<sup>a</sup> Virgínia Maria Barros de Lorena**  
Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães

---

**Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Programa de Pós-Graduação em Genética

Dedico este trabalho a meu sobrinho, Heitor, que pode ainda não entender o significado disso, mas que me inspira a cada dia querer ser melhor, saber mais e ser exemplo na sua formação.

## **AGRADECIMENTOS**

A pós-graduação é uma jornada árdua, longa e por vezes, solitária. É um momento de intenso aprendizado e amadurecimento. Para mim, o mestrado foi uma fase de superação, fé e confiança, precisei acreditar em mim e contar com a fé e confiança que tanto minha família como minha mentora e meus amigos depositaram em mim. Neste trabalho concluo uma das fases mais importantes da minha vida e perseverei nessa vida que escolhi.

Agradeço primeiramente aos meus pais que foram meu alicerce e me deram forças para continuar mesmo nas horas mais difíceis.

À minha mentora, Jaqueline, agradeço a confiança, dedicação e paciência a mim concedidas. Mesmo nos momentos de maior dificuldade, sempre procurou por soluções e esteve sempre presente.

Em nenhum momento durante a minha vida científica estive só, sempre pude contar o suporte da minha orientadora ou de meus melhores amigos Jorge e Natassia, amigos esses que sempre tiram de mim as melhores risadas, me ajudam a passar pelos momentos mais difíceis e compartilham comigo seus sonhos. Amo vocês!

Não posso deixar de agradecer à Suelen, inspiração de ser humano e profissional, amiga para todas as horas que sempre foi presente nesta trajetória.

Agradeço ainda à minha amada irmã que me ofereceu suporte durante todo o primeiro ano do meu mestrado e me deu o meu maior presente, meu amado sobrinho, Heitor, a quem dedico este trabalho por sempre nas horas mais difíceis me oferecer um doce sorriso, uma risada gostosa ou um abraço apertado. Amo você, meu pequeno!

Agradeço também ao Dr. Dinaldo Cavalcanti que foi fundamental para conclusão deste trabalho e à enfermeira Ana, que gentilmente me ajudou nas etapas de coleta.

Agradeço ainda aos órgãos de fomento FACEPE e CNPq, pela bolsa a mim concedida e ao LIKA por fornecer a estrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

Dedico este trabalho a minha avó Carminha, que não está mais presente em vida, mas continua a me proteger e me guiar por todos os meus passos. Saudades. E finalmente agradeço a Deus pelo seu amor infinito.

O que somos é resultado da interação entre a genética de nossos pais, os ensinamentos de nossos mentores e o local em que crescemos. Somos multifatoriais.

Maria Eduarda Borborema, 2017

## RESUMO

A aterosclerose é um processo inflamatório e progressivo que ocorre no endotélio dos vasos arteriais no qual várias vias inflamatórias são ativadas, entre elas o inflamassoma, que desencadeia a morte celular por piroptose, sendo vários fatores de risco associados ao seu desenvolvimento, entre eles a deficiência de vitamina D. O presente estudo, do tipo experimental e analítico, avaliou a expressão dos genes do inflamassoma *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP-1* e *IL-1 $\beta$* , e do receptor da vitamina D (*VDR*) objetivando o melhor entendimento dessas vias na aterosclerose e na gravidade da lesão aterosclerótica. Para isso, foi utilizado o método estatístico  $2^{-\Delta\Delta CT}$  comparando a expressão em pacientes com aterosclerose (n=40) e indivíduos controle (n=20), verificando uma diferença na expressão dos genes *NLRP1*, *NLRC4*, *IL-1 $\beta$*  e *VDR* (+3,47, +7,06, +2,43 e -13.62 vezes, respectivamente). Quando comparado o grau da lesão encontramos que indivíduos com lesões iniciais (n=20) apresentam uma diferença de expressão dos genes *NLRP1*, *NLRC4*, *IL-1 $\beta$*  e *VDR* (+2,87, +6,34, +3,39 e -8,48 vezes, respectivamente), enquanto que os que apresentam lesões mais graves (n=20) apresentam uma diferença na expressão dos genes *NLRP1* e *NLRC4* e *VDR* (+2,87, +5,45 e -31.51 vezes, respectivamente). Os indivíduos com lesões mais graves expressam menos *IL-1 $\beta$*  em comparação aos que apresentam lesões iniciais (-2,81 vezes). Os nossos resultados oferecem um melhor entendimento da atuação do inflamassoma e da vitamina D na aterosclerose.

**Palavras-chave:** Doenças cardiovasculares. Piroptose. Inflamassoma. Vitamina D. Morte celular.

## ABSTRACT

Atherosclerosis is an inflammatory and progressive process that occurs in the endothelium of the arterial vessels which several inflammatory pathways are activated, among them the inflammasome complex, which triggers cell death by pyroptosis, a number of risk factors are implicated in atherosclerosis development, including vitamin D deficiency. The present study, experimental and analytical, evaluated the expression profile of the inflammatory genes *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP-1* and *IL-1 $\beta$* , and the vitamin D receptor (*VDR*) aiming at the better understanding of these pathways in atherosclerosis and its severity. The statistical method  $2^{-\Delta\Delta CT}$  was used to compared the expression between patients with atherosclerosis (n=40) and control subjects (n=20). A differential expression of *NLRP1*, *NLRC4*, *IL-1 $\beta$*  and *VDR* (+3.47, +7.06, +2.43 and -13.62 fold change, respectively) was observed in this patients. When the severity of lesion was assessed, individuals with initial lesions (n=20) showed a differential expression of the *NLRP1*, *NLRC4*, *IL-1 $\beta$*  and *VDR* genes (+2.87, +6.34, +3.39 and -8,48 fold change, respectively), while those that present severe lesions (n=20) showed a differential expression in *NLRP1*, *NLRC4* and *VDR* genes (+2.87, +5.45 and -31.51 fold change, respectively). We also verified that individuals with severe lesions expressed less *IL-1 $\beta$*  compared to those with initial lesions (-2.81 fold change). For all analyses  $p < 0.05$  was considerate statistically significant. Our results provide a better understanding of the role of inflammasome and vitamin d in atherosclerosis.

**Key-words:** Cardiovascular diseases. Pyroptosis. Inflammasome. Vitamin D. Cell death.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Separação de fases durante protocolo de extração de RNA por Trizol.  
..... 25
- Figura 2:** Processo de formação das células espumosas na camada íntima do endotélio vascular através da retenção de LDLox dentro dos macrófagos. .... 31
- Figura 3:** Diferentes tipos de inflamassoma já descritos, os quais são ativados por diferentes PAMPs e DAMPs..... 38
- Figura 4:** Metabolismo da vitamina D a partir da exposição solar e processamento do 7-deidrocolesterol até a sua forma ativa final a 1,25 $\alpha$ -dihidroxitamina D (VD3).  
..... 41
- Figura 5:** Esquema sobre atuação da vitamina D pelo VDR através de respostas rápidas e genômicas. .... 43
- Figura 6:** Ativação do VDR pela vitamina D, heterodimerização com o RXR e regulação da transcrição de genes. .... 44

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Perfil de expressão de genes do Inflamassoma em pacientes com aterosclerose (DCV) e indivíduos saudáveis (CDC). \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ )..... 50
- Gráfico 2:** Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene NLRP1 de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ )..... 51
- Gráfico 3:** Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene NLRC4 de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ )..... 52
- Gráfico 4:** Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene CASP-1 de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles ..... 53
- Gráfico 5:** Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene IL-1B de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ )..... 54
- Gráfico 6:** Gráfico comparando níveis de mRNA do gene IL-1B de pacientes com lesões ateroscleróticas graves vs. aqueles com lesões iniciais. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ )..... 54
- Gráfico 7:** Gráfico demonstrando o perfil de expressão do gene do Receptor da Vitamina D (VDR) em pacientes com aterosclerose (DCV) e indivíduos saudáveis (CDC). \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). ..... 58

**Gráfico 8:** Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene VDR de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ )..... 59

**Gráfico 9:** Gráfico comparando níveis de mRNA do gene VDR de pacientes com lesões ateroscleróticas graves vs. aqueles com lesões iniciais. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ )..... 59

**Gráfico 10:** Gráfico apresentando níveis séricos de IL-1B em pacientes com aterosclerose (DCV) e indivíduos saudáveis (CDC)..... 61

**Gráfico 11:** Gráfico apresentando níveis séricos de IL-1B de acordo com o grau de progressão da lesão aterosclerótica..... 62

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual (> 18 anos). Fonte:(WHO 2014) ..... 22
- Tabela 2:** Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos. Fonte: (WHO 2014) ..... 23
- Tabela 3:** Valores de referência do perfil lipídico para adultos maiores de 20 anos. .... 23
- Tabela 4:** Classificação de peso pelo IMC (Índice de Massa Corporal). Fonte: WHO,2017..... 24
- Tabela 5:** Planilha com dados clínicos e demográficos dos indivíduos participantes do estudo. .... 49

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
1 $\alpha$ ,25-(OH)D <sub>3</sub>	Vitamina D <sub>3</sub> , colecalciferol
25(OH)D <sub>2</sub>	Vitamina D <sub>2</sub> , ergocalciferol
A	Adenina
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing CARD</i>
AVE	Acidente vascular encefálico
C	Citosina
CAM	<i>Cellular Adhesion Molecule</i>
CASP	Caspase
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
CDC	Controles Doenças Cardiovasculares
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAMP	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i>
DCVs	Doenças Cardiovasculares
dL	Decilitro
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DP	Desvio padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ER	Receptores Estrogênicos
G	Guanina
GUSB	Beta Glucuronidase
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL	Interleucina
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
Kg	Quilograma
L	Litro
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLox	<i>Low Density Lipoprotein oxidized</i>
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mg	Miligramma
mmHg	Milímetros de mercúrio
mL	Mililitros
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
N	Número amostral
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear de transcrição kappa beta
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NLR	<i>NOD-like Receptor</i>
NLRC4	<i>NOD-like Receptor CARD domain containing-4</i>

NLRP1	<i>NOD-like Receptor</i> Pyrin domain containing-1
NLRP3	<i>NOD-like Receptor</i> Pyrin domain containing-3
nmol	Nanomolar
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	Picogramas
PRR	Receptores de reconhecimento de patógenos
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase Reversa
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
T	Timina
TBE	Tris base EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Células auxiliares do tipo 1 (T helper)
Th2	Células auxiliares do tipo 2 (T helper)
TLR	Receptores tipo Toll (botão)
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
U	Unidade
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UVB	Ultravioleta B
VCAM-1	<i>Vascular cell Adhesion Molecule-1</i>
VD	Vitamina D
VD <sub>2</sub>	Vitamina D <sub>2</sub> , ergocalciferol
VD <sub>3</sub>	Vitamina D <sub>3</sub> , colecalciferol
VDR	Receptor da Vitamina D
VDR-AP	Sítio Alternativo de ligação do Receptor da Vitamina D
VDRE	Elementos de Resposta à Vitamina D
VDR-GP	Sítio Genômico de ligação do Receptor da Vitamina D
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
%	Porcento
°C	Graus Celcius
≥	Maior ou igual que
>	Maior que
<	Menor que
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO.....	17
1.2 OBJETIVOS.....	20
<b>1.2.1 Objetivo Geral</b> .....	20
<b>1.2.2 Objetivos Específicos</b> .....	20
1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	21
<b>1.3.1 Local do Estudo e Considerações Éticas</b> .....	21
<b>1.3.2 Grupo de Estudo</b> .....	21
<b>1.3.3 Critérios de Exclusão</b> .....	22
<b>1.3.4 Coleta do Material</b> .....	24
<b>1.3.5 Isolamento do RNA</b> .....	25
<b>1.3.6 Síntese de cDNA</b> .....	26
<b>1.3.7 Ensaio de Expressão Gênica</b> .....	27
<b>1.3.8 Dosagem da IL-1<math>\beta</math></b> .....	27
<b>1.3.9 Tipo de Estudo e Análises Estatísticas</b> .....	28
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	29
2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	29
2.2 ATEROSCLEROSE.....	29
2.3 MORTE CELULAR .....	34
2.4 VITAMINA D .....	40
2.5 RECEPTOR DA VITAMINA D .....	43
2.6 VITAMINA D, ATEROSCLEROSE E MORTE CELULAR.....	45
<b>3 ANÁLISE DE RESULTADOS</b> .....	48
3.1 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.....	48
3.2 ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA .....	50
<b>3.2.1 Perfil de expressão gênica relativa do Inflamassoma na Aterosclerose</b> .....	50
<b>3.2.2 Perfil de Expressão do Inflamassoma e os graus de lesão Aterosclerótica</b> .....	51
<b>3.2.3 Perfil de Expressão Gênica do Inflamassoma</b> .....	54
3.3 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DO VDR NA ATEROSCLEROSE .....	57
<b>3.3.1 Perfil de Expressão do VDR e os Graus de Lesões Ateroscleróticas</b> .....	58
<b>3.3.2 Perfil de Expressão Gênica do VDR</b> .....	60
3.4 ANÁLISES SOROLÓGICAS.....	61

<b>3.4.1 Níveis Séricos da IL-1<math>\beta</math></b> .....	61
<b>3.4.2 Níveis Séricos da IL-1<math>\beta</math> e Aterosclerose</b> .....	62
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>APÊNDICE A – TCLE</b> .....	73
<b>APÊNDICE B – MANUSCRITO I</b> .....	76
<b>APÊNDICE C – MANUSCRITO II</b> .....	77
<b>APÊNDICE D – MANUSCRITO III</b> .....	78

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Doenças cardiovasculares (DCVs) compreendem um grupo de patologias que acometem o coração e/ou vasos sanguíneos. Responsáveis por cerca de 30% das mortes registradas em todo o mundo, as principais DCVs são provenientes da aterosclerose. Processo multifatorial, crônico e inflamatório que se caracteriza pela formação de placas na parede do vaso arterial, que podem levar ao comprometimento do fluxo sanguíneo e conseqüentemente a oxigenação dos tecidos. Vários fatores de risco contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, entre eles destacam-se a hipertensão arterial sistêmica, a diabetes e a dislipidemia.

Acredita-se que espécies reativas de oxigênio (ROS) derivadas do excesso de colesterol e glicose na corrente sanguínea podem lesar o endotélio atuando como DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*) e desta forma desencadear um processo inflamatório, que inicialmente possui caráter protetor, entretanto na manutenção dos fatores que levam ao dano endotelial, este processo se torna crônico e progressivo. DAMPs e PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) ativam o complexo inflamassoma através dos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs). Os PRRs compreendem uma classe de receptores de membrana, os “*Toll-like*” (TRLs), e duas de receptores citoplasmáticos, os “*retinoic acid-inducible gene 1-like*” e os “*NOD-like*” (NLRs), este último componente do complexo inflamassoma.

O inflamassoma típico é constituído por uma proteína reconhecedora (NLR), uma proteína adaptadora (ASC – do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e uma caspase como molécula efetora. A

caspase-1 é responsável por clivar a pro-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$ , interleucina essencial ao desencadeamento da resposta inflamatória, e por desencadear a morte celular por piroptose, característico das células precursoras da placa aterosclerótica.

Estudos recentes demonstram que o estresse causado à receptores estrogênicos podem desencadear a ativação do inflamassoma, desta forma hormônios como a vitamina D (VD) têm sido alvo de estudo para o entendimento de como essa ativação ocorre e o papel deste frente a formação da placa aterosclerótica.

A vitamina D na sua forma ativa, VD<sub>3</sub>, desempenha diversas atividades no organismo quando em níveis séricos considerados ótimos, dentre elas destaca-se a atividade imunomoduladora e cardioprotetora. Atuando por meio do seu receptor, o VDR (*Vitamin D Receptor*), a VD<sub>3</sub> é capaz de modular o perfil de resposta inflamatória inibindo Th1 (*T-helper*) e induzindo Th2 e inibir o estresse oxidativo aumentando a expressão da enzima óxido nítrico sintase, produtora de NO (óxido nítrico) e reduzindo a produção de ROS. Além de outras inúmeras atividades, a vitamina D modula a expressão da pro-IL-1 $\beta$  por meio de VDREs (Elementos de resposta à Vitamina D) presentes na região promotora do gene, e ainda pode estar modulando sua ativação em IL-1 $\beta$  pela ativação do inflamassoma.

Desta forma, entender como apresenta-se o perfil de expressão gênica do inflamassoma em indivíduos com aterosclerose pode ajudar no entendimento de que complexos estão sendo ativados para desencadeamento da piroptose, como este tipo de morte celular pode estar influenciando na progressão da lesão e

como níveis séricos de vitamina D e a expressão do VDR podem estar atuando frente a esses processos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar em pacientes com aterosclerose a ativação da piroptose pelo complexo inflamassoma, e como se apresenta a expressão do receptor da vitamina D de acordo com a gravidade da placa aterosclerótica.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ativação da piroptose através do complexo inflamassoma acessando os níveis de mRNA dos genes NLRP1, NLRC4, CASP-1 e IL-1 $\beta$ , comparando a expressão gênica relativa destes em pacientes com graves lesões ateroscleróticas, pacientes com lesões iniciais e indivíduos controle;
- Avaliar a expressão gênica relativa do *VDR*, comparando o grau de progressão da lesão e a presença de lesões ateroscleróticas.
- Dosar os níveis séricos de IL-1 $\beta$  em todos os grupos estudados e comparar os níveis séricos com a expressão do *VDR*, a ativação do inflamassoma e a gravidade da lesão;

## 1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 1.3.1 Local do Estudo e Considerações Éticas

O projeto foi desenvolvido no setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) localizado na Universidade Federal de Pernambuco. As amostras dos pacientes foram oriundas do setor de hemodinâmica do Hospital da Ilha do Leite do Recife/PE, coletadas entre os meses de setembro e novembro de 2017, e as amostras controles provenientes do banco de controles do laboratório. O estudo é aprovado no CEP–UFPE (30667014.5.0000.5208). Todos os indivíduos incluídos no projeto preenchem os critérios de inclusão/exclusão do estudo e só participam da pesquisa após concordarem e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

### 1.3.2 Grupo de Estudo

Os pacientes participantes da pesquisa foram divididos em dois grupos, o primeiro constituído de indivíduos que apresentam três ou mais lesões ateroscleróticas graves (estenose acometendo  $\geq 70\%$  da artéria) confirmadas por laudo de cateterismo (Anexo 2). O segundo grupo de pacientes apresentando até três lesões iniciais (estenose de até 30% da artéria) também confirmadas por laudo de cateterismo. O grupo controle é constituído apenas por indivíduos saudáveis que não apresentam nenhum fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (obesidade, dislipidemia, hipertensão e diabetes) ou qualquer outra doença inflamatória, infecciosa ou autoimune.

### 1.3.3 Critérios de Exclusão

Os indivíduos incluídos no grupo de controles não se enquadravam em nenhum dos critérios a seguir:

- I. Apresentar pressão arterial com valores superiores a 130/85 mmHg (sistólica e diastólica, respectivamente) (**Tabela 1**);
- II. Apresentar valores de dosagem de glicose >100mg/dL em jejum (**Tabela 2**);
- III. Apresentar qualquer tipo de dislipidemia, seguindo os critérios da Sociedade Brasileira de Cardiologia (**Tabela 3**);
- IV. Apresentar IMC (Índice de Massa Corporal) superior a 25Kg/m<sup>2</sup>, por ser classificado como pré-obeso, obesos do tipo I, II e III, e apresentar risco de comorbidades maior em relação aos indivíduos de peso normal, segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (**Tabela 4**).

**Tabela 1:** Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual (> 18 anos).

<b>Classificação</b>	<b>Pressão sistólica*</b>	<b>Pressão diastólica*</b>
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio I	140-159	90-99
Hipertensão estágio II	160-179	100-109
Hipertensão estágio III	≥180	≥110
Hipertensão sistólica isolada	≥140	<90

Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial. \*Valores dados em mmHg.

Fonte:(WHO 2014)

**Tabela 2:** Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos.

<b>Categoria</b>	<b>Jejum*</b>	<b>2h após 75g de glicose</b>	<b>Casual**</b>
Glicemia normal	<100	<140	
Tolerância à glicose diminuída	100 < 126	≥140 <200	
Diabetes mellitus	≥126	≥200	≥200 (com sintomas clássicos)***

\*O jejum é definido como a falta de ingestão calórica por no mínimo 8 horas;

\*\*Glicemia plasmática casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição;

\*\*\* Sintomas clássicos da DM incluem poliúria e perda não explicada de peso.

Fonte: (WHO 2014)

**Tabela 3:** Valores de referência do perfil lipídico para adultos maiores de 20 anos.

<b>Lipídeos</b>	<b>Valores (mg/dL)</b>	<b>Categoria</b>
Colesterol total	<200	Desejável
	200-239	Limítrofe
	≥240	Alto
LDL	<100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
HDL	160-189	Alto
	≥190	Muito alto
	>60	Desejável
HDL	<40	Baixo
	<150	Desejável
	150-200	Limítrofe

Triglicerídeos	200-499	Alto
	≥500	Muito alto

Fonte: (WHO 2014)

**Tabela 4:** Classificação de peso pelo IMC (Índice de Massa Corporal). Fonte: WHO,2017.

<b>Classificação</b>	<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Risco de comorbidades</b>
Baixo peso	<18,5	Baixo
Peso normal	18,5-24,9	Médio
Sobrepeso	≥25	Aumentado
Obeso I	30-34,9	Moderado
Obeso II	35-39,9	Grave
Obeso III	≥40	Muito grave

Fonte: (WHO 2014)

### 1.3.4 Coleta do Material

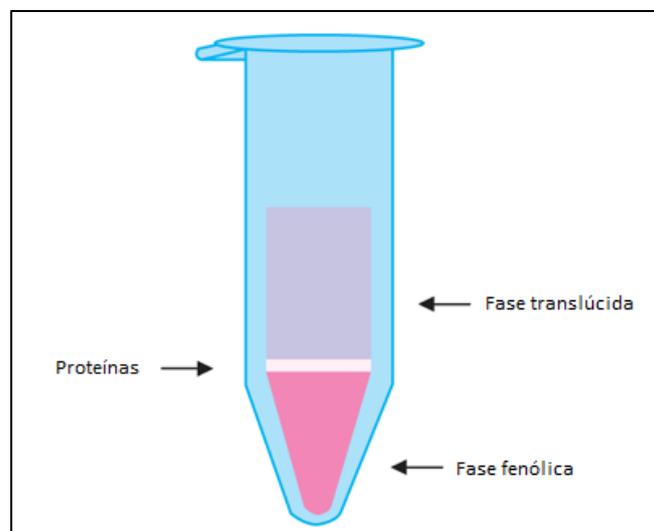
Para realização do estudo, foi coletado sangue total periférico de cada indivíduo participante da pesquisa, para isso foram utilizados dois tubos de 4 mL cada. O primeiro sendo um tubo seco e o segundo contendo EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético). Após a coleta, os tubos foram mantidos no gelo e processados em seguida. O tubo seco foi centrifugado a 2.200rpm por 15min para separação do soro, que foi transferido para tubo plástico de 2mL e armazenado a -80°C até prosseguir para análise. O tubo contendo EDTA foi utilizado para extração do RNA.

### 1.3.5 Isolamento do RNA

O RNA total foi isolado usando o reagente Trizol® e seguindo as instruções do fabricante. Após a coleta de sangue total periférico em tubo com EDTA, 150µL de sangue total foi transferido para um tubo com 750µL de Trizol® e homogeneizado vigorosamente, seguindo para um período de 10 minutos de descanso em temperatura ambiente, essas células foram transferidas para um tubo, onde foi acrescentado 150µL de clorofórmio, seguido por uma agitação vigorosa e posterior centrifugação a 12.000rpm, durante 15 minutos a 4°C.

Após a separação por gradiente de densidade, apenas a fase translúcida do material foi transferida para um outro tubo no qual foi acrescentado à amostra 375µL de isopropanol (100%) para fixação do RNA (**Figura 1**).

**Figura 1:** Separação de fases durante protocolo de extração de RNA por Trizol.



**Fonte:** Biologia molecular: fundamentos e aplicações nas ciências da saúde.

A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 12.000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e ao pellet foi adicionado 750µL de etanol (75%). O tubo foi então vortexado brevemente e centrifugado a 7.500rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi

descartado, e após secagem completa da amostra, o pellet foi ressuspendido em 30µL água ultrapura. A amostra homogeneizada foi então incubada a 55°C por 15 minutos.

O controle de qualidade das amostras foi realizado através de espectrofotometria (Nanodrop 2000c – Thermo Scientific) para quantificação de ácidos nucleicos e por eletroforese para verificação da integridade do material. A eletroforese foi feita em gel de agarose a 0,8%, tampão TBE a 0,5x (tris, ácido bórico e EDTA) e 4µL de brometo de etídio RNase free a 1%, durante 20 minutos a 60 volts, para posterior visualização da amostra no transiluminador.

### **1.3.6 Síntese de cDNA**

A concentração padrão de RNA total para síntese de cDNA considerada padrão neste trabalho foi de 500ng. O cDNA foi sintetizado usando o kit comercial *GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT)*, da Promega. Inicialmente 500ng de RNA foram diluídos em 10µL de *Nuclease-Free Water* e submetidos ao termociclador por um ciclo a 70°C por 5 minutos para desnaturação do RNA a estruturas secundárias, com posterior choque térmico no gelo, onde foi mantido por pelo menos 5 minutos. À amostra foi adicionado 10µL de um mix composto por 4µL de *Nuclease-Free water*, 4µL de *GoScript™ Reaction Buffer, Oligo(dT)* e 2µL de *GoScript™ Enzyme Mix*. A amostra foi mais uma vez encaminhada para o termociclador para um ciclo de 5 minutos a 25°C para anelamento do primer, 60 minutos a 42°C para extensão e 15 minutos a 70°C para inativação da enzima. Amostra foi por final diluída em 80µL de água e armazenada em freezer a -20°C.

### 1.3.7 Ensaios de Expressão Gênica

Os ensaios de expressão gênica foram realizados de acordo com a normas propostas de padronização por Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foram usadas sondas fluorogênicas específicas do tipo Taqman (Thermo Fisher Scientific), para os genes alvo *VDR* (Hs00172113\_m1), *NLRP1*(Hs00248187\_m1), *NLRC4* (Hs00892666\_m1), *CASP-1* (Hs00354836\_m1) e *IL-1 $\beta$*  (Hs01555410\_m1). Para o gene de referência GUSB, o ensaio de foi realizado usando SyBR Green e o par de iniciadores: direto: CACTGTGGCTGTCACCAAGA e reverso: TCCGCATCCTCATGCTTGTT. Os ensaios foram realizados em duplicata biológica e triplicata técnica.

Inicialmente as amostras de cDNA foram descongeladas no gelo. O preparo da reação inicia-se aplicando-se 2 $\mu$ L da amostra em placa/tubo óptico e adicionando uma reação composta de 6 $\mu$ L de água ultrapura, 6 $\mu$ L de TaqMan® Master Mix universal (Thermo Fisher Scientific) e 0,6 $\mu$ L de sonda de expressão TaqMan® para os genes *VDR*, *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP-1* e *IL-1 $\beta$* . Para o gene de referência GUSB a reação foi composta de 4,4 $\mu$ L de água ultrapura, 3 $\mu$ L de *SyBR Green mix* e 1,6 $\mu$ L do par de iniciadores.

Os ensaios de quantificação relativa foram realizados no equipamento ABI7500 (Applied Biosystems) e o método de análise foi o  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para a quantificação relativa da expressão gênica.

### 1.3.8 Dosagem da IL-1 $\beta$

A avaliação dos níveis séricos da citocina IL-1 $\beta$  em pacientes e controles foi feita pela técnica do ensaio de imunoabsorção enzimática, o ELISA, a partir do soro obtido do sangue total periférico dos indivíduos. Para isso, foi utilizado o

kit comercial Human IL-1 $\beta$  Screening Set da Thermo Scientific, seguindo as recomendações do fabricante. Para realizar a detecção da IL-1 $\beta$  nas amostras, uma curva padrão foi estabelecida a partir dos controles disponibilizados pelo kit, com um coeficiente de correlação  $R^2=0,958$ .

### **1.3.9 Tipo de Estudo e Análises Estatísticas**

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle. Todos os ensaios foram realizados em duplicata biológica e os resultados apresentados por média dos grupos e desvio padrão. Os testes estatísticos empregados foram realizados pelo software Microsoft® Excel® 2016 considerando como estatisticamente significativos valores com  $p<0,05$  em um intervalo de confiança de 95%. Para verificar o tipo de distribuição da amostra foi realizado o teste de Shapiro-Wil. Os resultados foram comparados por análise de variância do teste T de Student.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCVs) constituem um grupo de patologias que afetam coração e vasos sanguíneos (MENDIS, 2017). Em 2012, 46% das mortes por doenças de comunicação não compulsória foram devido à DCVs, totalizando 17.5 milhões de óbitos, dos quais 7.4 milhões foram devido à doença arterial coronariana, 6.7 milhões ao infarto e os demais (3.4 milhões) foram atribuídos à falha cardíaca e arritmias, como consequência de fatores como hipertensão e outras cardiomiopatias (WHO, 2014).

Responsável por 29,4% de todas as mortes registradas no Brasil anualmente, mais de 308 mil pessoas faleceram devido à infartos agudos do miocárdio (IAM) ou acidente vascular encefálico (AVE) (WHO, 2014). Em estudo realizado pelo Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia em São Paulo foi verificado que 60% das vítimas de IAM e AVE são homens com média de idade de 56 anos. Essa alta frequência coloca o país entre os dez com maior índice de mortes por DCVs (MOREIRA et al., 2006).

Dentre as DCVs destacam-se principalmente as doenças arteriais coronarianas como o IAM, o AVE, arritmia cardíaca, doença arterial periférica, entre outros (NAGHAVI et al., 2015). A doença arterial coronária, a doença arterial periférica e o AVE são provenientes da aterosclerose (MENDIS; PUSKA; MENDIS S; PUSKA P; NORRVING B EDITORS, 2011).

### 2.2 ATEROSCLEROSE

Aterosclerose é a causa mais comum da doença isquêmica do coração e do infarto, sendo responsável por uma em cada quatro mortes no mundo

(NAGHAVI et al., 2015) . É um processo inflamatório, multifatorial e progressivo que ocorre na camada íntima do endotélio vascular, resultando no estreitamento e enfraquecimento do vaso, alterando o fluxo sanguíneo. Por ser uma doença multifatorial, fatores ambientais, imunológicos e genéticos regulam o processo de formação da placa aterosclerótica ou ateroma (ALIE et al., 2014).

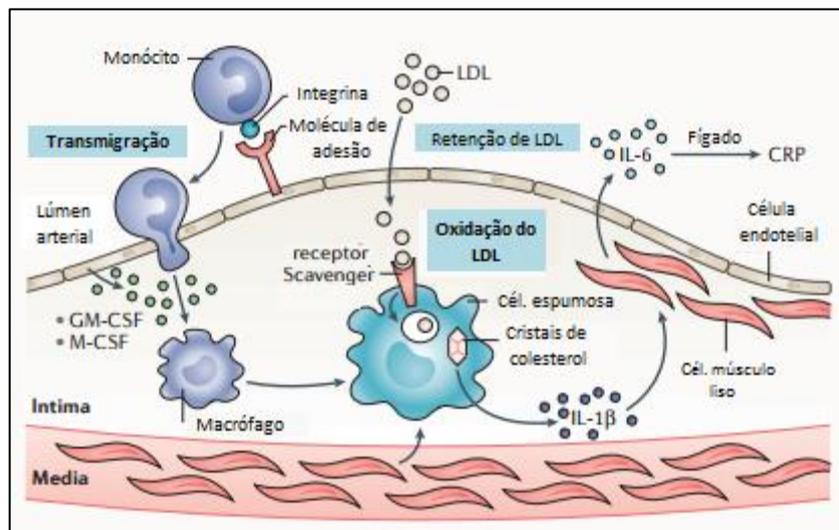
Caracterizada principalmente por ser uma forma específica de inflamação na parede endotelial dos vasos sanguíneos, hipotetiza-se que a aterosclerose inicia-se por uma disfunção nas células endoteliais acompanhada por interações entre lipoproteínas plasmáticas e componentes celulares (Linfócitos T, monócitos / macrófagos, células endoteliais e células de músculo liso) (KASSI et al., 2013).

Vários fatores de risco são relacionados com o desenvolvimento da aterosclerose, como: idade avançada, ser do sexo masculino, histórico familiar e anormalidades genéticas; além do modo de vida: obesidade, sedentarismo e estresse, que podem levar ao desenvolvimento de hipertensão, diabetes e dislipidemia, fatores potencialmente controláveis (AHMADI-ABHARI et al., 2017).

Sabe-se que o endotélio compõe uma interface metabolicamente ativa entre o sangue e os tecidos, contribuindo na modulação do fluxo sanguíneo, no transporte de nutrientes, na coagulação e na migração de leucócitos. Além disso, ele também sintetiza importantes substâncias bioativas como o óxido nítrico através da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que regulam a estrutura e a função dos vasos sanguíneos (LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002). O óxido nítrico inibe, de forma geral, o processo aterosclerótico e exerce função protetora sobre o aparelho cardiovascular (MACCALLINI; MOLLICA; AMOROSO, 2017).

Atualmente a hipótese mais aceita sobre a formação da placa aterosclerótica enfatiza a proliferação celular da íntima e relaciona com a organização e o crescimento repetitivo de trombos. Este conceito, chamado hipótese de resposta a lesão, considera a aterosclerose como uma resposta inflamatória crônica na parede do vaso iniciada por uma lesão no endotélio (GISTERÁ; HANSSON, 2017) (**Figura 2**). Trazer a figura para junto da chamada.

**Figura 2:** Processo de formação das células espumosas na camada íntima do endotélio vascular através da retenção de LDLox dentro dos macrófagos.



**Fonte:** Adaptado de Gistera et al. *The immunology of atherosclerosis* – 2017.

Sob condições normais, células endoteliais inibem a adesão de leucócitos e plaquetas à superfície vascular (ANDRADE, 2009). Injúrias endoteliais estimulam essas células à ativar a expressão de moléculas de adesão de leucócitos (CAMs), que estimulam o rolamento desses leucócitos ao longo da superfície vascular, mas preferencialmente em locais de esforço hemodinâmico, no qual a força de fricção do sangue em movimento sobre o endotélio, “*shear stress*”, baixo ou oscilatório reduz a produção de óxido nítrico (NO), aumenta a expressão de fator de transcrição nuclear inflamatório (NF-κB), além de aumentar a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 (*Intercellular*

*Adhesion Molecule-1*), VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein-1*) e E-selectinas, regulando também o padrão de moléculas juncionais nas células endoteliais (CUNNINGHAM; GOTLIEB, 2005).

Acredita-se que outro fator determinante nas alterações endoteliais seja o efeito adverso da hiperlipidemia, que quando crônica, pode lesar as células endoteliais ao elevar a produção de radicais livres de oxigênio, ROS, que desmobilizam o NO, principal fator de relaxamento endotelial (SKALÉN et al., 2002). A infiltração de LDL na camada íntima arterial leva a retenção dessas partículas em proteoglicanos no espaço subendotelial, sendo o evento iniciador no desenvolvimento da aterosclerose (GISTERÅ; HANSSON, 2017). As lipoproteínas presas são bioquimicamente modificadas por proteases e lipases, levando à sua agregação e aumento do proteoglicano ligado (PENTIKÄINEN et al., 2000) (**Figura 1**). Modificações oxidativas por mieloperoxidases, lipoxigenases e ROS conduzem à formação de LDLox, o que pode juntamente com outros fatores levar a uma lesão endotelial e desencadeando um processo inflamatório que medeia o estabelecimento, a progressão e as complicações da aterosclerose (HANSSON; HERMANSSON, 2011; MACCALLINI; MOLLICA; AMOROSO, 2017).

Uma vez aderidos ao endotélio, os monócitos através da ligação a receptores específicos iniciam o processo de rolamento e quimiotaxia se alojando na íntima, esse processo é mediado por citocinas. Ao se alojarem, os monócitos se diferenciam em macrófagos em resposta ao fator estimulante de colônia, produzido pelas células endoteliais e por vários outros tipos celulares. Como resultado do contínuo recrutamento e diferenciação, monócitos e

macrófagos são a maior população celular nas placas ateroscleróticas (ROBBINS et al., 2014) (**Figura 2**).

O recrutamento de monócitos e sua subsequente diferenciação em macrófagos, são considerados inicialmente como um processo protetor, entretanto o englobamento das moléculas de LDLox por essas células, leva a transformação dos macrófagos em células espumosas (CHARNEY; VASCULAR, 2015) (**Figura 2**).

O LDLox promove a ativação do macrófago, este que expressa vários receptores Toll-like (TLR), que reconhecem patógenos e padrões moleculares associados danos (DAMP), o LDLox são reconhecidos pelos TLR-2 e TLR-4 (MILLER et al., 2003). O MyD88, molécula sinalizadora de vários TLRs, confere um sinal pró-aterosclerótico através da expressão do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, que estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$  e IL-6. Macrófagos expressam o receptor scavenger, este por sua vez, responsável pela captura do LDLox para dentro da célula; em contraste aos outros receptores de LDL, o CD36 não é reprimido em resposta aos níveis de colesterol intracelular (LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002). A entrada de LDLox na célula também é mediada pela pinocitose (BUONO et al., 2009).

A incapacidade dos macrófagos em digerir as partículas lipídicas leva a formação da célula espumosa. Essas, por sua vez, ficam aprisionadas na camada íntima do endotélio vascular, por terem a capacidade migratória comprometida (YOUNG; FEBBRAIO; SILVERSTEIN, 2009). Elas eventualmente morrem e criam uma área central na placa, que consiste em células em apoptose e necrose, cristais de colesterol e outros materiais extracelulares (LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002) (**Figura 2**).

Os leucócitos ativados e as células endoteliais liberam mediadores fibrogênicos, incluindo fatores de crescimento que promovem a proliferação das células endoteliais contribuindo assim na formação da placa (ALIE et al., 2014).

### 2.3 MORTE CELULAR

A aterosclerose resulta do acúmulo de células inflamatórias e vasculares entre as camadas íntima e média do endotélio vascular (RAYNER, 2017). Quando as vias metabólicas ativadas são preferencialmente as de recrutamento, sobrevivência e proliferação celular sobre as de morte celular programada, ocorre a progressão da placa e extensão da lesão (RANDOLPH, 2014). Entretanto, se ocorre a perturbação no balanço de ativação dessas vias de morte celular, pode gerar o acúmulo de detritos celulares, que atuam como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que seriam identificados por macrófagos e favoreceriam um ambiente pró-inflamatório, levando à instabilidade da lesão aterosclerótica (RAYNER, 2017).

Indivíduos que apresentam fatores de risco ao desenvolvimento da aterosclerose como excesso de colesterol e acúmulo de gordura, apresentam vias de ativação do sistema imune inato mais sensíveis ao desencadeamento de uma resposta imune (RANDOLPH, 2014). Nos indivíduos que apresentam tais fatores, é iniciada a remoção de restos celulares e outros materiais potencialmente citotóxicos pela ativação de receptores do tipo *scavenger*, no entanto, se durante décadas de vida houver alta circulação de colesterol, essa resposta, inicialmente protetora, transforma-se em uma doença crônica (RAYNER, 2017).

O orquestramento de como as vias de morte celular estão sendo ativadas e o momento exato em que cada via é desencadeada é crucial para o

estabelecimento, progressão e estabilidade da lesão aterosclerótica (RANDOLPH, 2014). Visto que a morte de macrófagos no início da lesão aterosclerótica pode diminuir a resposta inflamatória, entretanto o mesmo tipo de morte dessas células em fases mais avançadas da lesão, pode promover a formação de um núcleo necrótico e gerar uma instabilidade da placa (MOORE; TABAS, 2011).

Na aterosclerose, a morte do macrófago é fortemente associada à inflamação (HANSSON, 2005). Quando o macrófago não é efetivamente eliminado na aterogênese ou na progressão da placa, o acúmulo dessas células resulta na formação do núcleo necrótico e consequente liberação de citocinas inflamatórias. Além de quimiocinas, proteases e lipídios, que antes encontravam-se dentro dessas células no espaço extracelular, o que desencadeia o aumento da inflamação, da susceptibilidade à ruptura da placa aterosclerótica e à formação de trombos (HANSSON, 2005; MOORE; TABAS, 2011).

Em estudo realizado em murinos, Liu et al demonstrou que a morte celular por apoptose é necessária para reduzir a quantidade de macrófagos no local da lesão, pelo menos na fase inicial da lesão, limitando assim a expansão desta (LIU, 2004). A apoptose é um processo de morte celular programada que desencadeia alterações morfológicas nas células, como fragmentação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, que posteriormente serão digeridos pelas células fagocíticas (ELMORE, 2007). É um processo regulado dependente da ativação de caspases, que são enzimas que degradam proteínas (proteases) (ELMORE, 2007).

A apoptose no início da aterogênese é eficaz na redução da placa e do tamanho do núcleo necrótico, inesperadamente, a apoptose, quando a lesão já

é bem estabelecida, não altera a progressão da lesão ou mesmo afeta a estabilidade da placa (O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011). Além da apoptose, outras formas de morte celular programada são atuantes no processo de formação da placa e em alguns casos contribuem para a progressão da lesão (RAYNER, 2017). Entre elas está a piroptose, uma morte celular lítica, dependente de caspase, que compartilha características tanto da apoptose, como da necrose (RAYNER, 2017).

Proteases aspartato-específicas cisteína-dependentes (caspases) constituem uma classe de proteases intracelulares conservadas ao longo da evolução (YANG, 2013). Vários membros da família das caspases destacam-se como mediadores críticos da inflamação e na resposta imune inata, sendo assim designadas como caspases inflamatórias, sendo elas as caspases 1, 4 e 5 (MARTINON; TSCHOPP, 2007).

A caspase-1 é precursora das demais caspases inflamatórias e é encontrada no citosol na forma de pró-caspase-1, um zimogênio inativo (YIN et al., 2015). Existem cerca de 70 substratos proteicos para a caspase-1, a maioria dos quais desempenham importante papel na aterogênese e inflamação vascular (MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011).

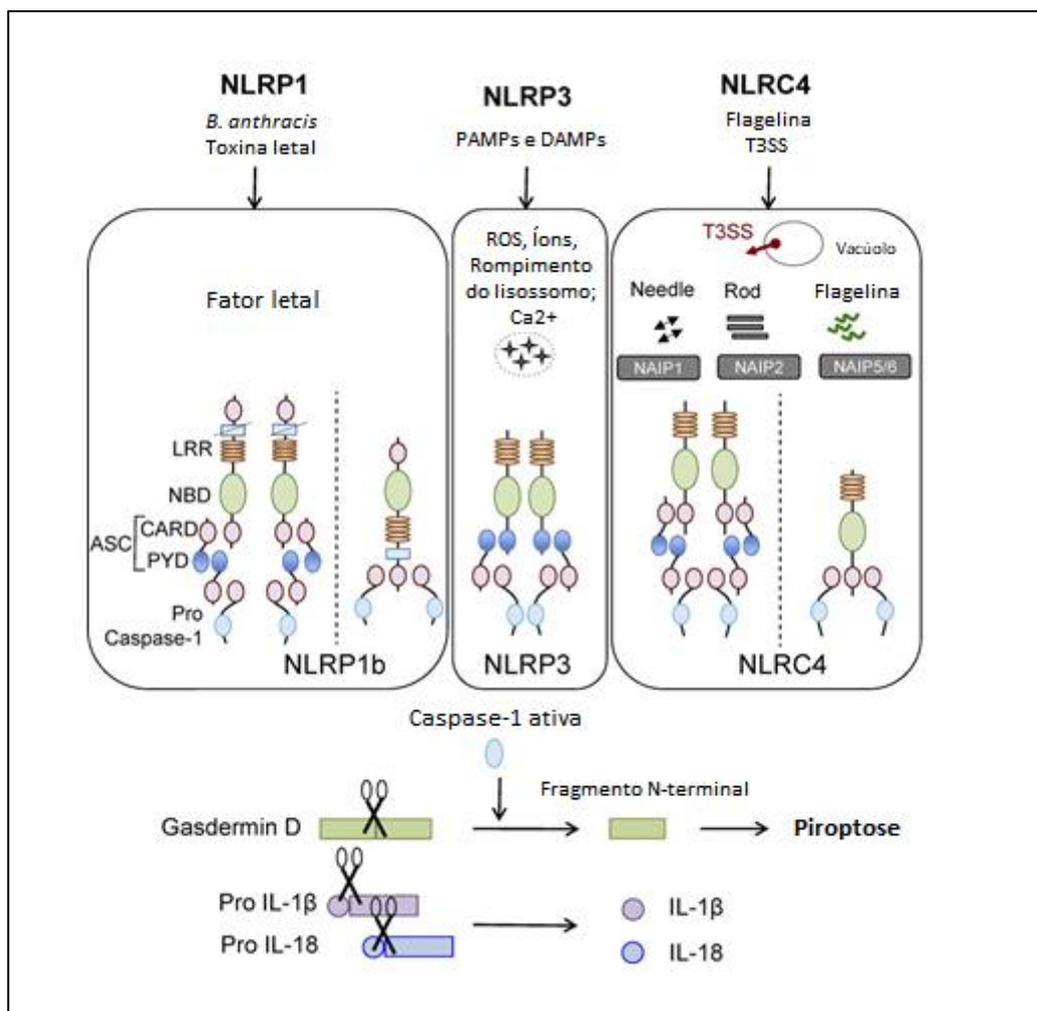
A ativação da caspase-1 pró-inflamatória pode resultar na morte celular regulada, a piroptose, que é caracterizada pela lise celular pela liberação do conteúdo citoplasmático no espaço extracelular, resultando no aumento da inflamação (FINK; COOKSON, 2005). A caspase-1 ativada leva a formação de poros na membrana plasmática (1,1 a 2,4nm de diâmetro), que permitem que o gradiente iônico celular se dissipe, aumentando a pressão osmótica, inchando a célula (BERGSBAKEN; COOKSON, 2007; FINK; COOKSON, 2006). A

membrana celular de células na piroptose se rompem e rapidamente é formada uma vesícula em forma de balão ao redor do núcleo, este por sua vez sofre arredondamento e condensação, mantendo a integridade nuclear, entretanto sofrem fragmentação do DNA (BERGSBAKEN; COOKSON, 2007; MARIATHASAN et al., 2005; MOLOFSKY et al., 2006). A ruptura da placa está associada à uma forte imunorreatividade da caspase-1, relacionada mais fortemente com a instabilidade da placa aterosclerótica, sendo a ativação da piroptose exclusiva pelas caspases-1 e 11 (LABBÉ; SALEH, 2008).

As caspases são estimuladas em resposta a diversos estímulos que são inicialmente detectados pelo complexo inflamassoma, além disso, duas vias distintas de ativação da piroptose são conhecidas, sendo elas a canônica, ativada pela caspase-1 e a não canônica, ativada pela caspase-11 (KAYAGAKI et al., 2011).

O termo inflamassoma refere-se a via canônica, que por sua vez ativa caspase-1 em resposta à PAMPs ou DAMPs (AACHOUI et al., 2013). O complexo inflamassoma é composto por proteínas acessórias e proteínas *scaffold* auto-oligomerizantes que pertencem aos receptores de domínio de oligomerização de ligação à nucleotídeos (Família NLR) (ZHENG; GARDNER; CLARKE, 2011). Quatro destes receptores foram identificados, são eles o NLRP1, NLRP3, NLRC4 e o AIM2 (KAYAGAKI et al., 2011) (**Figura 3**).

**Figura 3:** Diferentes tipos de inflamassoma já descritos, os quais são ativados por diferentes PAMPs e DAMPs



**Fonte:** adaptado de Sharma and Kanneganti 2016.

O NLRP3 (do inglês, NLR, *pyrin domain containing 3*) é o receptor mais bem estudado, por ser ativado por uma grande variedade de agonistas incluindo ATP (adenosina trifosfato), toxinas formadoras de poros, compostos cristalinos, ácidos nucleicos, hialurônicos, bem como DAMPs e PAMPs (VANAJA; RATHINAM; FITZGERALD, 2015) (**Figura 3**).

O NLRC4 (do inglês, NLR, *CARD domain containing 4*) responde à flagelina bacteriana e a um componente de haste do sistema de secreção do tipo III (TTSS), utilizado geralmente por bactérias gram-negativas para liberação de

fatores de virulência no citosol de células hospedeiras (MIAO et al., 2010; ZHAO et al., 2011) (**Figura 3**).

O NLRP1 (do inglês, NLR, *pyrin domain containing 1*) reconhece a toxina letal do *Bacillus anthracis*, o *Toxoplasma gondii*, o dipeptídeo muramil e a depleção intracelular de ATP (CHAVARRÍA-SMITH; VANCE, 2015) (**Figura 3**).

Por meio de interações homotípicas, os NLRs se ligam aos domínios de sinalização (PYD ou CARD), que por sua vez interagem com a proteína de recrutamento de caspase (ASC), que recruta pro-caspase-1, levando à sua dimerização e processamento auto-proteolítico, gerando a caspase-1 (AACHOUI et al., 2013). O NLRC-4 recruta diretamente a pró-caspase-1, sem necessidade da formação do complexo e da ASC, ativa cataliticamente a caspase-1 e a piroptose (BROZ et al., 2010) (**Figura 3**). A caspase-1 é necessária para a clivagem da pró-interleucina (IL)-1 $\beta$  e da pró-IL-18 em citocinas pró-inflamatórias maduras IL-1 $\beta$  e IL-18, respectivamente (SHEN et al., 2010) (**Figura 3**).

A IL-1 $\beta$  é uma potente citocina pró-inflamatória atuando como mediadora chave da resposta inflamatória do hospedeiro frente à infecções e lesões (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). Capaz de induzir a produção de citocinas em macrófagos e células dendríticas, atuando sobre os linfócitos e regulando a expressão de outras interleucinas como a IL-2 (SHAW; MCDERMOTT; KANNEGANTI, 2011). É produzida na forma de um precursor inativo de 31kDa, denominado pró-IL-1 $\beta$ , em resposta à PAMPs reconhecidos por macrófagos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Os PAMPs atuam por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) em macrófagos e desta forma regulam a expressão de diversos genes (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

O NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) é um receptor do tipo PRR que atua ativando, exclusivamente, a resposta inflamatória após detecção do dipeptídeo muramil (WANG et al., 2014). A expressão deste receptor pode ser modulada pelo hormônio  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 em monócitos e macrófagos, além de aumentar a produção da pró-IL-1 $\beta$ , demonstrando o papel deste composto na modulação do sistema imune inato (LEE et al., 2011).

## 2.4 VITAMINA D

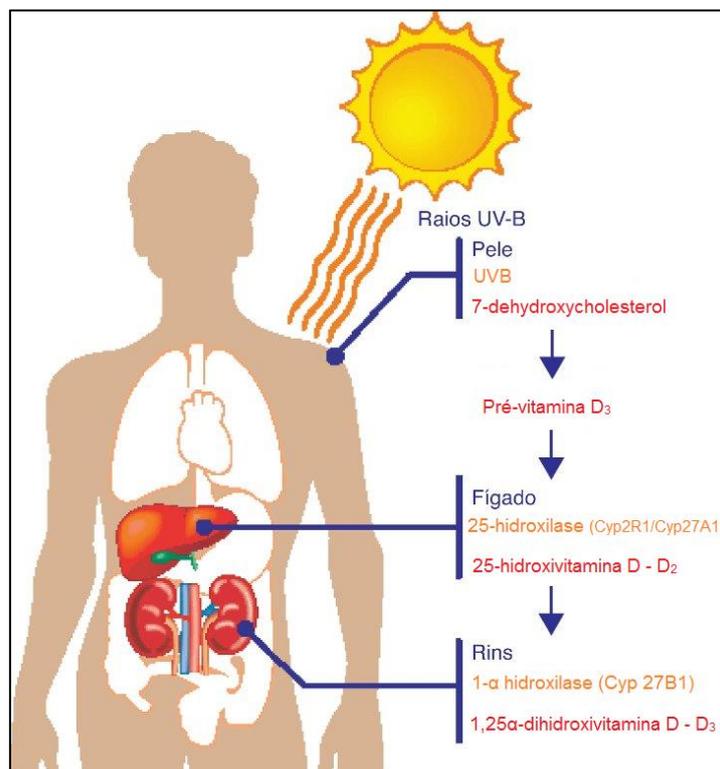
A vitamina D (VD) é sintetizada pelas formas mais ancestrais de diversos organismos, há mais de 750 milhões de anos. Fitoplanctons, zooplanctons e muitas formas de plantas e animais que são expostos à luz solar possuem a capacidade de sintetizar a VD (HOLICK et al., 2011).

A vitamina D é um hormônio lipossolúvel secoesteróide, e é assim chamado por possuir um dos anéis aromáticos clivado. Dois secoesteróides naturais são reconhecidos: o ergocalciferol, também chamado de 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> (25(OH)D) e o colecalciferol ou  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D<sub>3</sub> ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), ambos derivados da clivagem fotolítica dos anéis B do ergosterol e 7-dehidrocolecalciferol (LOPES MARQUES, 2010) (**Figura 4**).

A VD<sub>2</sub> é predominantemente obtida a partir de fontes vegetais e os suplementos de VD<sub>2</sub> (produzido a partir de irradiação do esteroide ergosterol levedura). A VD<sub>3</sub> é produzida na pele humana a partir do 7-dehidrocolesterol após exposição à radiação ultravioleta do tipo B (UVB, comprimento de onda de 320-280nm), proveniente de emissão solar, com isso sofre uma clivagem fotoquímica originando a pré-vitamina D<sub>3</sub> (HOLICK et al., 2011). Esta molécula

termolábil em um período de 48 horas pode sofrer um rearranjo molecular dependente de temperatura para formação da VD<sub>3</sub>, ou passar por um processo de isomerização originando produtos biologicamente inativos – luminosterol e taquisterol, o que evita a superprodução de VD após longos períodos de exposição à radiação ultravioleta. Entretanto, mesmo após a bioativação na pele, estes precursores necessitam ainda serem submetidos a uma sequência de hidroxilações até se tornarem biologicamente ativos (LOPES MARQUES, 2010) (Figura 4).

**Figura 4:** Metabolismo da vitamina D a partir da exposição solar e processamento do 7-deidrocolesterol até a sua forma ativa final a 1,25 $\alpha$ -dihidroxitamina D (VD<sub>3</sub>).



Fonte: Adaptado de Lichtenstein, 2013.

Por ter caráter lipossolúvel, a pré-vitamina D<sub>3</sub> é incorporada a quilomicrons e transportada pelo sistema linfático em circulação venosa. Parte desta molécula é utilizada pelo tecido adiposo e muscular nos processos de diferenciação celular, mas a maior parte é transportada para o fígado, onde é

metabolizada pela citocromo P450 e enzimas como a 25-hidroxilase (microssomal CYP2R1 e CYP27A1 mitocondrial) em 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) ou D<sub>2</sub> (JONES, 2008).

O segundo processo de hidroxilação ocorre no túbulo proximal dos rins ou em qualquer tecido que expresse a CyP27B1 (CHRISTAKOS et al., 2011; HOLICK et al., 2011). Essa segunda hidroxilação pela 1 $\alpha$ -hidroxilase dá origem a forma ativa da VD com maior atividade fisiológica, a VD<sub>3</sub> (1,25 $\alpha$ (OH)<sub>2</sub>D) (JONES, 2008) (**Figura 4**). A forma ativa da VD é transportada para os tecidos alvos tais como ossos e intestino onde desempenham seu papel na homeostase de cálcio e fosfato, bem como atuam na proliferação, diferenciação celular, na modulação da resposta imune e no metabolismo ósseo pela absorção de cálcio (LOU et al., 2017).

As funções mais conhecidas da vitamina D envolvem o metabolismo ósseo e a homeostase do cálcio, mas recentemente foi relatada como um regulador pleiotrópico da fisiologia humana, tendo um papel importante na modulação do sistema imune e na proteção cardíaca (MARUOTTI; CANTATORE, 2010). Sua síntese é estimulada pelo hormônio da paratireoide e reprimida pelo cálcio, fosfato e a 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> em si, o fator limitante da velocidade do seu catabolismo é a sua degradação em 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e a 25(OH)D<sub>3</sub> em 24,25(OH)D<sub>3</sub> pela 24-hidroxilase que é codificada pelo gene CYP24A1; esse produtos de degradação são excretados pela urina (CHENG et al., 2004).

São considerados apropriados níveis acima de 50 nmol/L ou 20 ng/mL, classifica-se então a deficiência de vitamina D como: deficiência leve, quando a concentração de 25(OH)D<sub>2</sub> se encontra entre 50 e 25nmol/L; deficiência

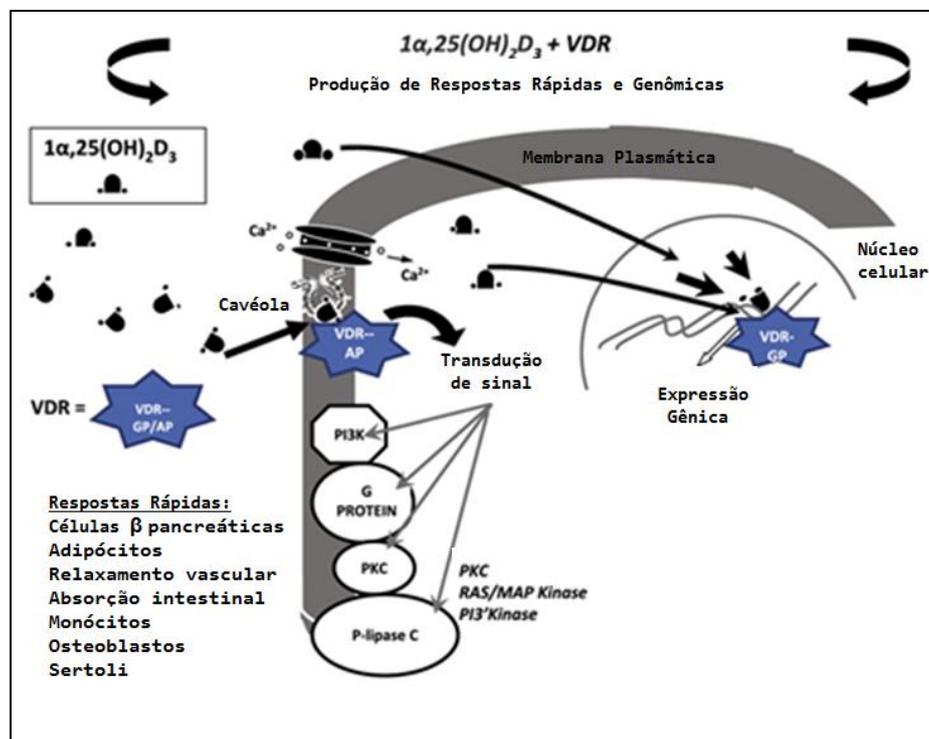
moderada, quando a concentração se encontra abaixo de 25 nmol/L e deficiência grave, quando a concentração se mostra abaixo de 12,5 nmol/L (ISAIA; DI STEFANO; BERGUI, 2006).

A ação da vitamina D é mediada através da ligação de sua forma ativa com o receptor de vitamina D, o VDR, que regula a transcrição de vários outros genes envolvidos na regulação da resposta imune, crescimento e homeostase (GRUYTER et al., 2017).

## 2.5 RECEPTOR DA VITAMINA D

O VDR possui dois sítios de ligação à vitamina D, o sítio de ligação genômico (GP) que atua pela regulação da expressão de vários genes, incluído o próprio *VDR*;

**Figura 5:** Esquema sobre atuação da vitamina D pelo VDR através de respostas rápidas e genômicas.

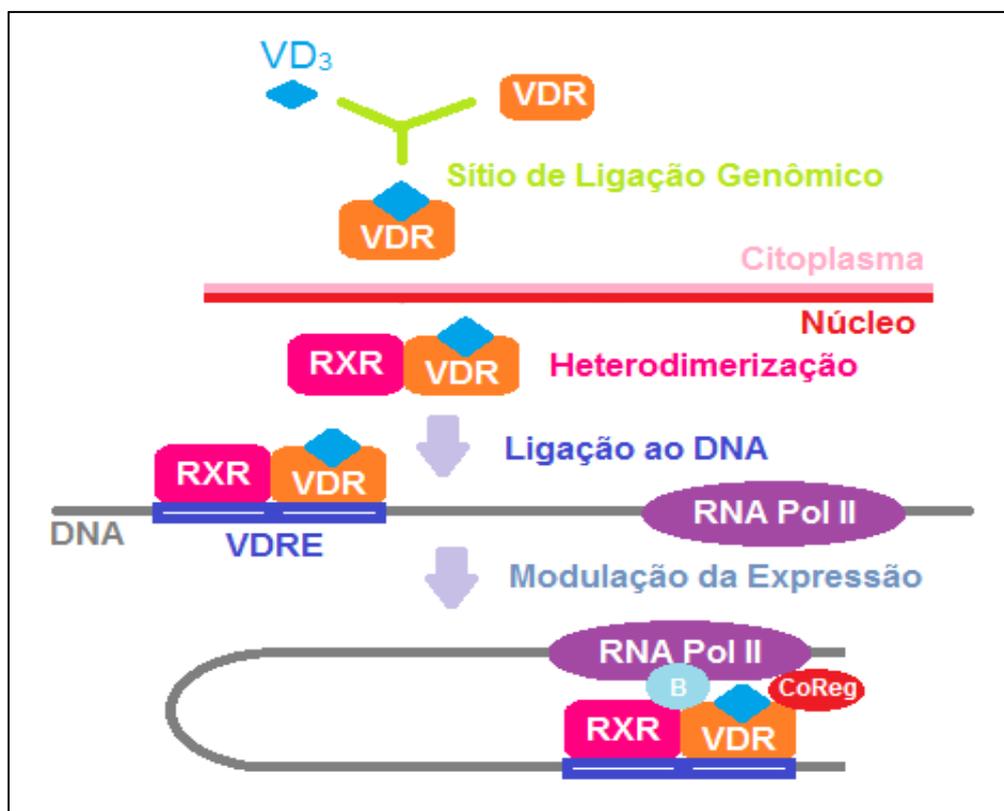


Fonte: Adaptado de Haussler et al, 2011.

e o sítio de ligação alternativo (AP), que atua através da transdução do sinal ativando outras moléculas em uma resposta rápida, até 45 minutos após o estímulo da vitamina D (WANG; ZHU; DELUCA, 2012) (**Figura 5**).

Quando ligada ao VDR-GP, um receptor nuclear presente no citoplasma, este se interioriza para o núcleo onde se heterodimeriza com um dos receptores de ácido retinóico (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ ), o que permite uma ligação específica e de alta afinidade aos VDREs localizados no DNA o que leva ao recrutamento de complexos formados por co-ativadores ou co-repressores que modulam a transcrição de genes alvo da VD (HAUSSLER et al., 2011; KAMEN; TANGPRICHA, 2010) (**Figuras 5 e 6**).

**Figura 6:** Ativação do VDR pela vitamina D, heterodimerização com o RXR e regulação da transcrição de genes.



Fonte: Adaptado de Dusso, 2003.

Os VDREs são sítios de ligação ao DNA que podem ativar ou suprimir os genes alvo (KOSZEWSKI; HERBERTH; MALLUCHE, 2010) e esses eventos são influenciados pelo tipo de receptor do ácido retinóico com os qual o VDR está associado. Este pode ser encontrado em vários tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, *natural killer* e linfócitos T e B ativados. Além disso, está envolvido na diferenciação e proliferação celular e variações genéticas no VDR têm sido associadas com concentrações circulantes no soro de 25(OH)D (ISAIA; DI STEFANO; BERGUI, 2006).

Além das respostas mediadas pelo receptor genômico, esse secoesteróide flexível é também capaz de iniciar respostas através de processos mais rápidos conhecidos como “respostas rápidas” quando a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se liga ao receptor alternativo, o VDR-AP, gerando um processo que dura de 1 a 45 minutos contrastando com a resposta mediada pelo receptor comum, o VDR-GP que pode levar de horas a dias para ser totalmente concluída, além de poderem ser bloqueadas por inibidores de transcrição e tradução (HAUSSLER et al., 2011). Isso sugere que o receptor de vitamina D alternativo se liga a um ligante com uma conformação estrutural diferente, a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (6-s-cis) ou conformação como esteroide, enquanto que para geração de uma resposta genômica a ligação é entre o VDR-GP e vitamina D em sua forma conformacional 6-s-trans (KAMEN; TANGPRICHA, 2010).

## 2.6 VITAMINA D, ATEROSCLEROSE E MORTE CELULAR

A deficiência de vitamina D está associada com um risco aumentado do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e é uma epidemia em grande parte não reconhecida, tendo em vista que cerca de 1 bilhão de pessoas no

mundo têm baixos níveis de 25-hidroxivitamina D [25 (OH) D; 80 nmol / L] (OH et al., 2009).

Estudos vêm demonstrando novos papéis da vitamina D e entre eles está relacionado o efeito inibidor desse hormônio na formação das células espumosas e principalmente a modulação da inflamação no local da lesão aterosclerótica (KASSI et al., 2013).

Sabe-se que o endotélio é o componente central no início do processo aterosclerótico na parede vascular (WALSKI et al., 2002). As células endoteliais expressam tanto o VDR como a CYP27B1, a coexistência desses dois elementos cruciais ao metabolismo da vitamina D, reforça a hipótese de que a VD<sub>3</sub> exerce o papel de modulador de funções endoteliais. Entre elas estão a estimulação da produção de NO pela ativação da NOS (QUEEN et al., 2006) e suprime a expressão de NADPH oxidase, principal complexo enzimático gerador de radicais superóxido (ROS), desta forma, a VD<sub>3</sub> reduz o dano oxidativo no endotélio e conseqüentemente o enrijecimento dos vasos sanguíneos e a lesão endotelial (HIRATA et al., 2013).

Ambas as respostas imunes inata e adaptativa estão envolvidas no processo aterogênico. A resposta Th1, dirigida por células T *helper*, direcionam a resposta inflamatória no processo aterosclerótico através da produção de citocinas como interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 que são pró-aterogênicas (ROBERTSON; HANSSON, 2006). Por outro lado, a resposta Th2 neutraliza pela secreção de IL-5, IL-10 e IL-13, a resposta Th1. A vitamina D estimula um perfil de resposta Th2 (anti-inflamatória), que inibe a resposta Th1 (pró-inflamatória), promovendo um efeito anti-aterogênico (KASSI et al., 2013).

A vitamina D<sub>3</sub> induz um fenótipo M1 em monócitos/macrófagos do tipo anti-aterogênico e inibe o fenótipo M2 (macrófago com elevado *uptake* e deposição de LDLox) do tipo pró-aterogênico, além de diminuir a expressão do mRNA de moléculas de adesão de monócitos (PSGL-1),  $\beta(1)$ -integrinas e  $\beta(2)$ -integrinas, resultando na menor adesão de monócitos ao endotélio lesionado/ativado (RIEK et al., 2012). A vitamina D também inibe a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  pelos monócitos a nível pós-transcricional, contribuindo com a supressão da resposta Th1 (OH et al., 2009).

Recente descoberta evidenciou que a VD<sub>3</sub> pode ainda aumentar a expressão da IL-1 $\beta$  tanto pelo aumento da expressão do gene pró-IL-1 $\beta$  pela atuação deste hormônio nas regiões de intensificação da expressão (acentuadores), como pelo aumento da produção de IL-1 $\beta$  pela via do inflamassoma (NLRP3) (LEE et al., 2011; TULK et al., 2015). Em estudo realizado em 2015, paradoxalmente a VD<sub>3</sub> conseguia aumentar a liberação de IL-1 $\beta$  madura por ativação do inflamassoma, ao mesmo tempo que suprimia a expressão de NLRP3 (TULK et al., 2015).

### 3 ANÁLISE DE RESULTADOS

#### 3.1 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Foram investigados o total de 60 (sessenta) indivíduos divididos em três grupos, o grupo de indivíduos com lesões ateroscleróticas graves (n=20), o grupo com lesões ateroscleróticas iniciais (n=20) e o grupo controle (n=20), constituído de indivíduos saudáveis.

A classificação étnica dos participantes da pesquisa foi realizada pelo pesquisador, considerando características fenotípicas de cada indivíduo, agrupando-os em três principais grupos étnicos: negros, pardos e caucasianos.

Todos os dados demográficos e clínicos relativos aos grupos avaliados estão descritos na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Planilha com dados clínicos e demográficos dos indivíduos participantes do estudo.**Características Demográficas e Clínicas**

<i>Variáveis</i>		Pacientes com lesões graves n (%)	Pacientes com lesões iniciais n (%)	Controles n (%)
<i>Sexo</i>	Masculino	13 (65%)	8 (40%)	11 (55%)
	Feminino	7 (35%)	12 (60%)	9 (45%)
<i>Etnia</i>	Negro	4 (20%)	5 (25%)	3 (15%)
	Pardo	8 (40%)	11 (55%)	10 (50%)
	Caucasiano	8 (40%)	4 (20%)	7 (35%)
<i>Idade (anos)</i>	Média (DP*)	60,4 (±10,75)	58,3 (±9,13)	36,15 (±6,38)
<i>Índice de Massa Corporal(Kg/m<sup>2</sup>)</i>	Média (DP*)	28,09 (±3,76)	28,78 (±5,09)	26,2 (±2,91)
<i>Circunferência abdominal (cm)</i>	Homens	99,46 (±10,37)	102,07 (±10,76)	90,18 (±9,95)
	Mulheres	103,23 (±7,93)	99,73 (±10,08)	89,68 (±9,18)
<i>Tabagismo</i>	Sim	2 (10%)	0 (0%)	1 (5%)
	Não	15 (75%)	19 (95%)	19 (95%)
	Ex-fumante	3 (15%)	1 (5%)	0 (0%)
<i>Atividade Física</i>	Sim	2 (10%)	5 (25%)	11 (55%)
	Não	18 (90%)	15 (75%)	9 (45%)
<i>Hipertensão Arterial Sistêmica</i>	Sim	19 (95%)	13 (65%)	0 (0%)
	Não	1 (5%)	7 (35%)	20 (100%)
<i>Diabetes Mellitus tipo 2</i>	Sim	8 (40%)	4 (20%)	0 (0%)
	Não	12 (60%)	16 (80%)	20 (100%)
<i>Dislipidemia</i>	Sim	10 (50%)	9 (45%)	0 (0%)
	Não	10 (50%)	11 (55%)	20 (100%)
<i>Infarto Agudo do Miocárdio</i>	Sim	8 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
	Não	12 (60%)	20 (100%)	20 (100%)

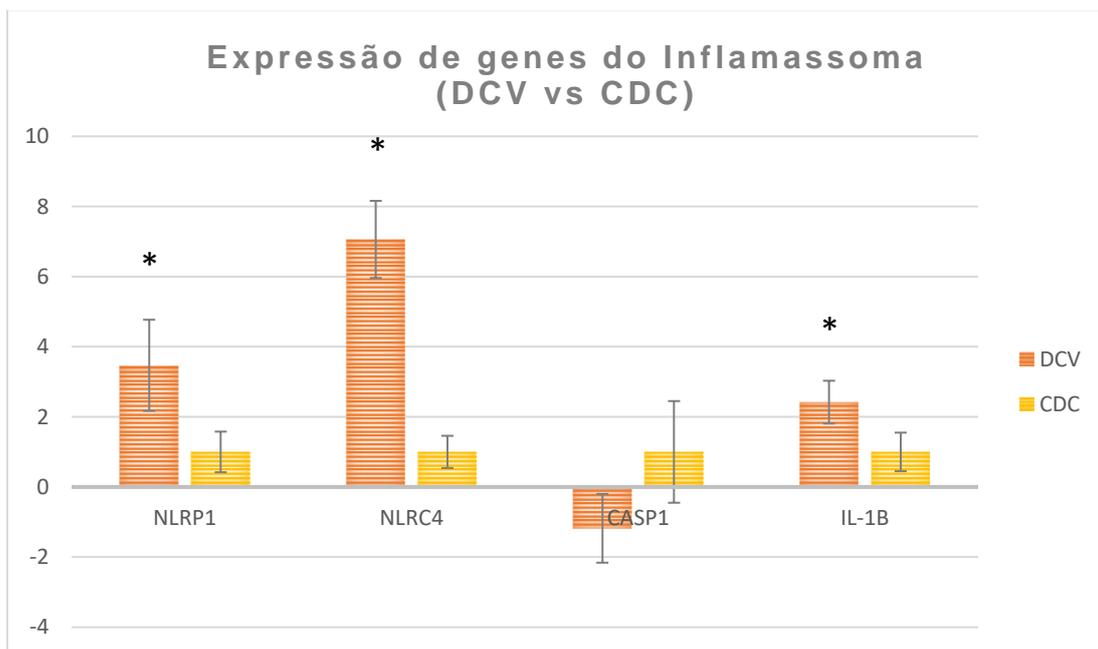
\*DP: Desvio Padrão **Fonte:** o autor, 2018.

### 3.2 ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA

#### 3.2.1 Perfil de expressão gênica relativa do Inflamassoma na Aterosclerose

Os níveis de mRNA dos genes *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP-1* e *IL-1 $\beta$*  em pacientes com aterosclerose – DCV (n=40), comparando aos indivíduos controles – CDC (n=20), encontramos um aumento da expressão estatisticamente significativo de 3,47 vezes do gene *NLRP1*, 7,06 vezes do gene *NLRC4* e 2,43 do gene *IL-1 $\beta$*  ( $p=5,16e^{-05}$ ,  $p=3,07e^{-05}$  e  $p=0,017$ , respectivamente). Para o gene *CASP-1* não foi encontrada nenhuma diferença de expressão.

**Gráfico 1:** Perfil de expressão de genes do Inflamassoma em pacientes com aterosclerose (DCV) e indivíduos saudáveis (CDC). \* Valores estatisticamente significativos ( $p<0,05$ ).



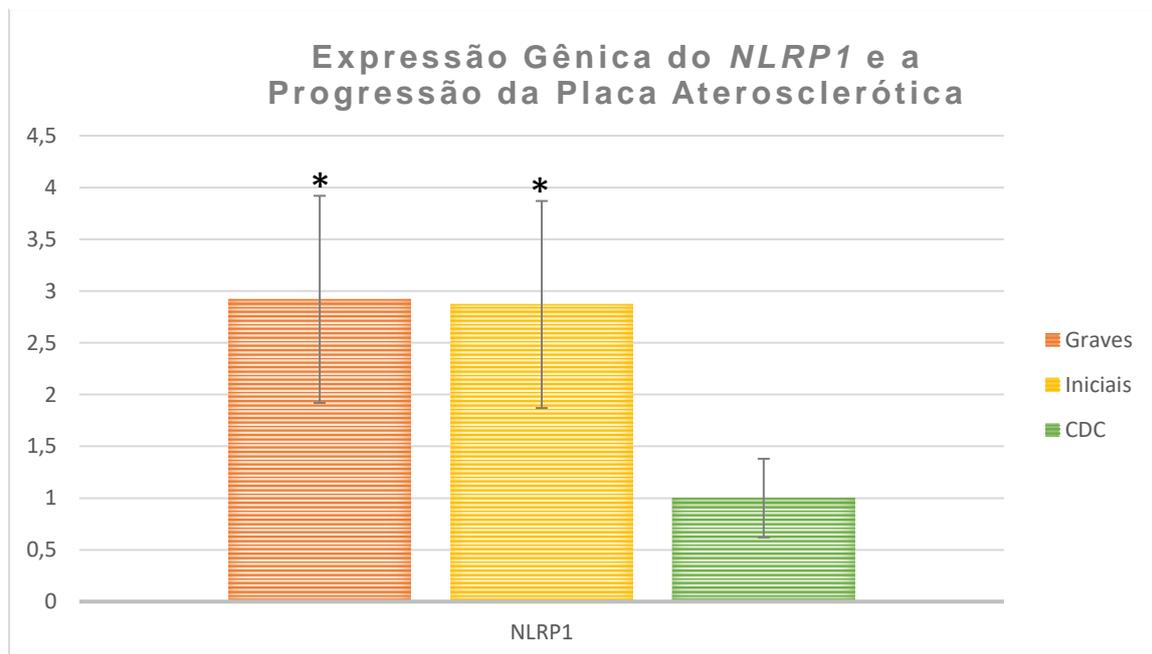
Fonte: o autor, 2018.

### 3.2.2 Perfil de Expressão do Inflamassoma e os graus de lesão Aterosclerótica

Quando comparada a expressão gênica relativa e o grau de progressão das lesões ateroscleróticas apresentadas pelos pacientes, foi identificado um aumento na expressão dos genes *NLRP1* e *NLRC4* estatisticamente significativo.

Para o gene *NLRP1* quando estratificado o grupo de pacientes com aterosclerose em lesões graves e lesões iniciais, verificou-se que este gene encontra-se mais expresso em ambos os casos quando comparados ao grupo controle em +2.92 e +2.87 vezes ( $p=0,0007$  e  $p=0,0008$ ), respectivamente. Quando comparado o grupo de lesões graves vs. lesões iniciais não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa da expressão.

Gráfico 2: Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene *NLRP1* de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles. \* Valores estatisticamente significativos ( $p<0,05$ ).

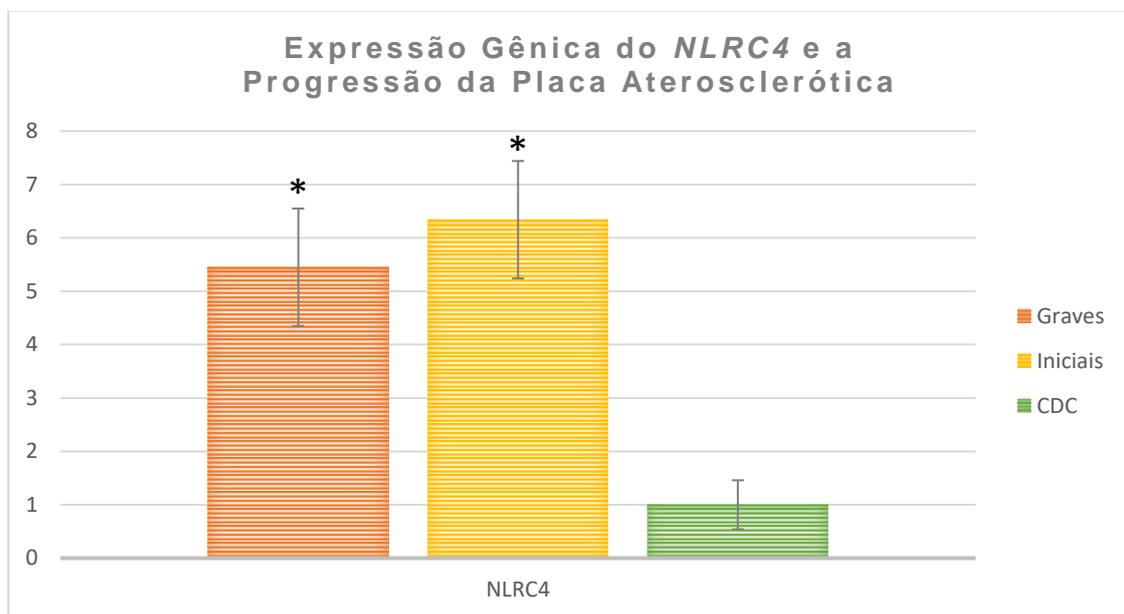


Fonte: o autor, 2018.

Quando avaliada a expressão do gene *NLRC4* entre os grupos estratificados de pacientes comparados aos controles foi verificado um aumento da expressão deste

tanto para o grupo de lesões graves (5.45 vezes) como para o de lesões iniciais (6.34 vezes), apresentando um  $p=4,158e^{-06}$  e  $p=9,200e^{-07}$ , respectivamente. Quando comparados os níveis de mRNA entre pacientes com lesões graves e iniciais, não encontramos diferença de expressão estatisticamente significativa.

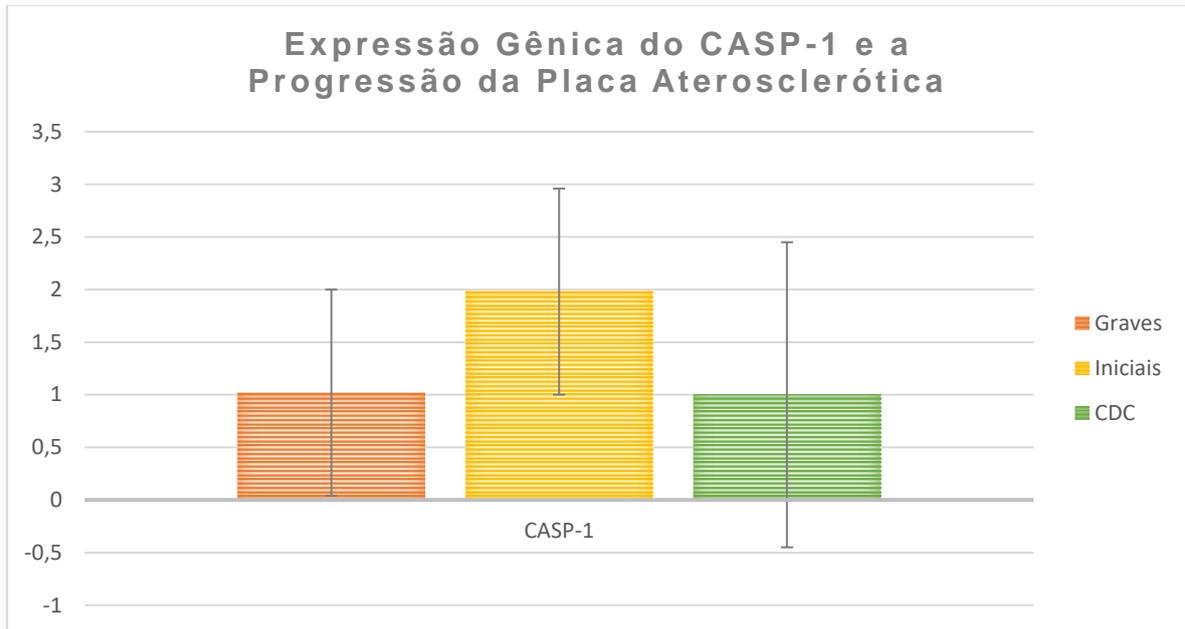
**Gráfico 3:** Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene *NLRC4* de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles. \* Valores estatisticamente significativos ( $p<0,05$ ).



Fonte: o autor, 2018.

Quando comparada a expressão do gene *CASP-1* entre os pacientes com lesões graves, lesões iniciais e controles, não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa.

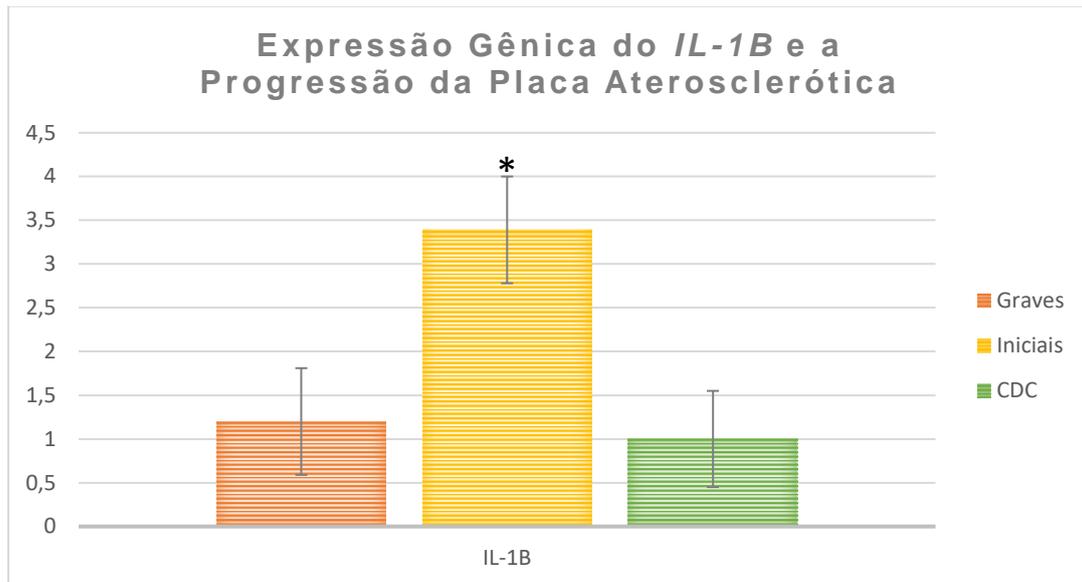
**Gráfico 4:** Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene CASP-1 de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles



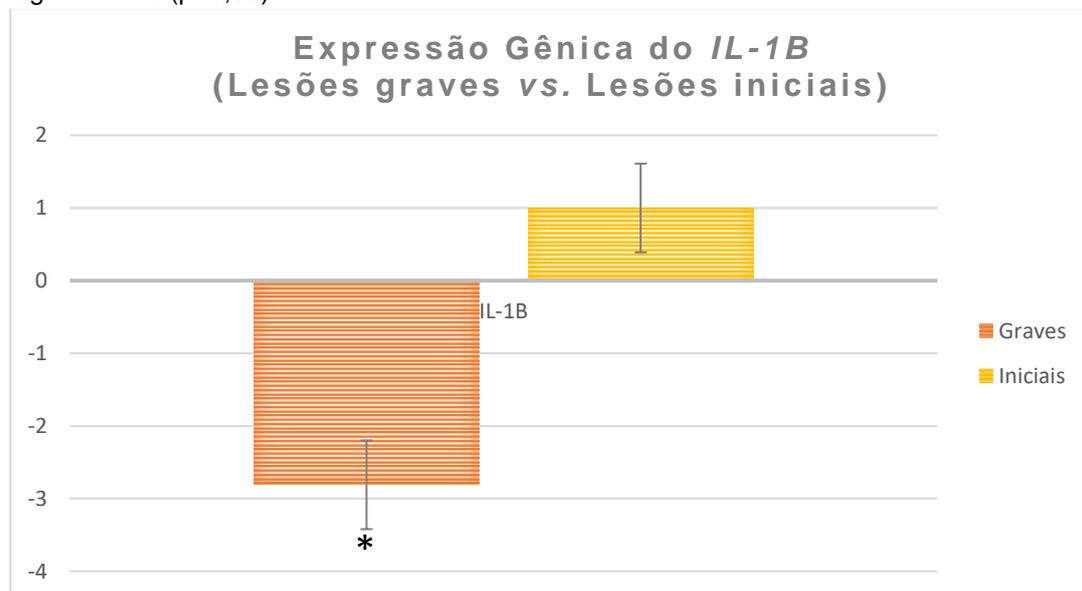
**Fonte:** o autor, 2018.

Para o gene *IL-1 $\beta$* , foi verificado um aumento estatisticamente significativo na sua expressão quando comparados os níveis de mRNA dos pacientes que apresentam lesões iniciais aos indivíduos controle, de 3,39 vezes ( $p=0,0014$ ). Não foi encontrada diferença de expressão entre os pacientes com lesões graves e o grupo controle, entretanto quando comparados níveis de mRNA entre os diferentes graus de lesão (lesões graves vs. lesões iniciais) observa-se que os pacientes com lesões mais graves estão expressando menos o gene *IL-1 $\beta$*  quando comparado ao grupo que apresenta lesões iniciais (-2.81 vezes,  $p=0,009$ ).

**Gráfico 5:** Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene *IL-1B* de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 6:** Gráfico comparando níveis de mRNA do gene *IL-1B* de pacientes com lesões ateroscleróticas graves vs. aqueles com lesões iniciais. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).



Fonte: o autor, 2018.

### 3.2.3 Perfil de Expressão Gênica do Inflamassoma

A análise da expressão gênica relativa realizada a partir de amostras de sangue total (*ex vivo*) de pacientes com aterosclerose comparado a indivíduos saudáveis, permitiu a identificação de que há ativação do complexo inflamassoma na formação

da placa aterosclerótica. Esta ativação pode vir a ser desencadeada também, pelos receptores “NOD-like” NLRP1 e NLRC4, visto que quando comparada a expressão dos genes codificadores dessas proteínas, o *NLRP1* e o *NLR4*, em pacientes com aterosclerose e indivíduos saudáveis foi encontrado um aumento da expressão desses.

Cada complexo molecular do inflamassoma é capaz de reconhecer diferentes PAMPs e DAMPs, desencadeando assim uma resposta inflamatória (SHAW; MCDERMOTT; KANNEGANTI, 2011). Altas concentrações de glicose e/ou de albumina glicada são capazes de estressar receptores estrógenos (ER), no estudo realizado por Soares *et al.* verificou-se que esse estresse poderia estar aumentando a expressão do gene do receptor NLRP1 por meio do fator de transcrição ATF-4, já descrito com importante papel na mediação da inflamação (CASTILHO *et al.*, 2012; D'OSUALDO *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2012). Desta forma, podemos hipotetizar que, por cerca de 30% dos pacientes com aterosclerose apresentarem DM2 e conseqüentemente, hiperglicemia, o aumento na expressão deste gene pode ser explicado. Em estudo realizado por Bleda *et al.* a expressão do *NLRP1* foi avaliada em pacientes com elevados níveis de colesterol VLDL e triglicérides, o que resultou numa relação positiva entre a expressão deste gene e a dislipidemia (BLEDA *et al.*, 2016a). Com base nos nossos resultados e nos achados de Bleda *et al.* podemos inferir ainda que o aumento da expressão deste gene, pode também ser devido ao fato de que cerca de 50% dos pacientes apresentam dislipidemia. Bleda *et al.* demonstrou ainda que, o NLRP1 é responsável pelo desencadeamento do estado pró-inflamatório em células endoteliais, o que reforça a hipótese de que este NLR pode contribuir com o desencadeamento da resposta inflamatória e a manutenção desta. Esse dado corrobora com os nossos achados,

onde a expressão do *NLRP1* permanece aumentada nas fases iniciais e mais graves da lesão aterosclerótica, quando comparada a indivíduos controles (BLEDA et al., 2014).

Diferentemente dos demais NLRs, o NLRC4 não precisa interagir com uma proteína adaptadora como a ASC para ativar a caspase-1, ele só precisa interagir com a proteína inibidora de apoptose (NAIP). O NLRC4, liga-se fisicamente à flagelina ou ao sistema de secreção do tipo III (T3SS), sendo assim caracterizado como uma proteína *scaffolding* (adaptadora). Essa possibilidade de ativação direta favorece a piroptose (ROMBERG; VOGEL; CANNA, 2017).

A ativação do inflamassoma é estranhamente sensível, sendo necessária apenas uma única molécula NAIP para desencadear a ativação da piroptose (HU et al., 2015). Essa sensível ativação do NLRC4 pode justificar o aumento da expressão do seu gene, encontrada em nosso estudo, em pacientes com aterosclerose.

Uma mutação missense descrita no gene *NLRC4* é capaz de induzir a ativação constante da caspase-1 e conseqüentemente aumentar a secreção de IL-1 $\beta$  (ZHAO et al., 2011). Em estudo realizado em murinos mutados para esse gene, verificou-se o desenvolvimento de doenças de caráter inflamatório como artrite e dermatite, caracterizando assim um papel desta proteína não apenas na defesa contra infecções bacterianas, mas também em respostas inflamatórias e autoimunes (HU et al., 2015).

A ativação do complexo inflamassoma resulta na liberação de caspase-1 ativa (LEI et al., 2017). Recentes estudos demonstram que os componentes desse complexo apresentam-se mais expressos em pacientes com aterosclerose (CHEN et al., 2013; XU et al., 2018). Em estudo realizado por Lee et al. em 2017, assim como em nossos achados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *CASP-1* em pacientes com aterosclerose (LEE et al., 2017). Lee

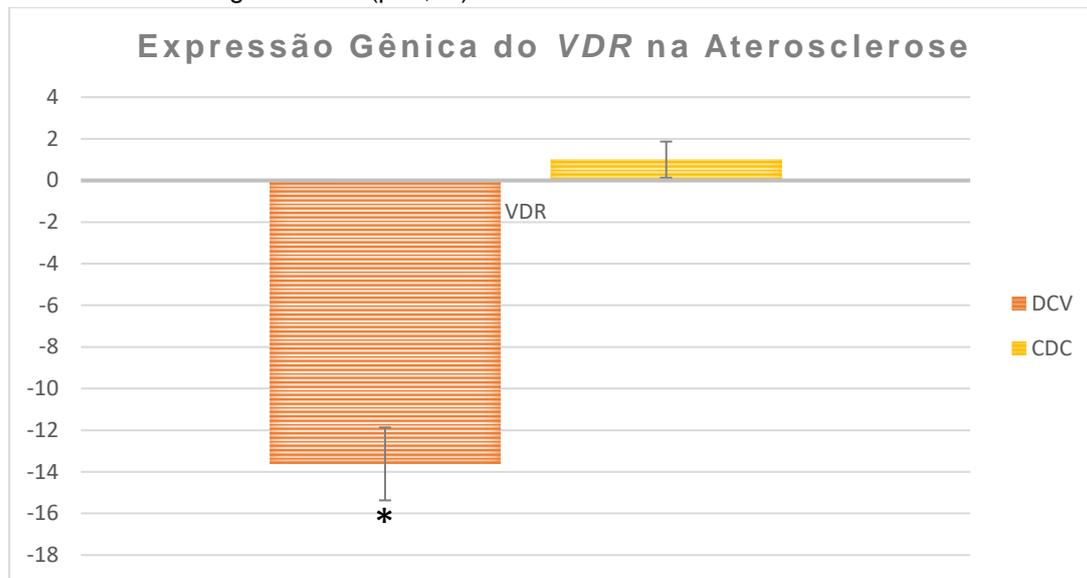
hipotetiza que esse resultado é possivelmente devido a uma regulação negativa da via de ativação dos NLRPs, como o uso de estatinas feito por cerca de 50% dos pacientes com aterosclerose envolvido em nosso estudo, corroborando assim com nossos achados (BLEDA et al., 2016b; DAGENAIS; SKELDON; SALEH, 2012; KONG et al., 2016; LEEMANS; CASSEL; SUTTERWALA, 2011; YANG et al., 2015; YU et al., 2017).

O produto final da via de ativação da piroptose pelo inflamassoma é a  $IL-1\beta$ , para ser ativa ela sofre um processo de clivagem pela caspase-1 (MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011). A piroptose é um processo de morte celular fundamental no início da formação da placa, visto que como primeiro mecanismo de defesa o organismo tenta diminuir a quantidade de células inflamatórias no local da lesão, encaminhando estas para a piroptose (XU et al., 2018). Corroborando com nossos achados, Lee et al encontrou que pacientes com lesões ateroscleróticas iniciais apresentam um aumento da expressão do gene  $IL-1\beta$ , enquanto que aqueles que apresentavam lesões graves não apresentavam diferença em relação ao controle (LEE et al., 2017). Assim como em nossos achados, demonstrando que pacientes com lesões iniciais apresentam uma maior expressão do  $IL-1\beta$ .

### 3.3 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DO *VDR* NA ATEROSCLEROSE

A análise realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  comparando o grupo de pacientes com aterosclerose e o controle, identificou que indivíduos com aterosclerose apresentam o gene *VDR* 13.62 vezes menos expresso em relação aos indivíduos saudáveis, dados estatisticamente significativos com valor de  $p=3,342e^{-16}$ .

**Gráfico 7:** Gráfico demonstrando o perfil de expressão do gene do Receptor da Viramina D (VDR) em pacientes com aterosclerose (DCV) e indivíduos saudáveis (CDC). \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).



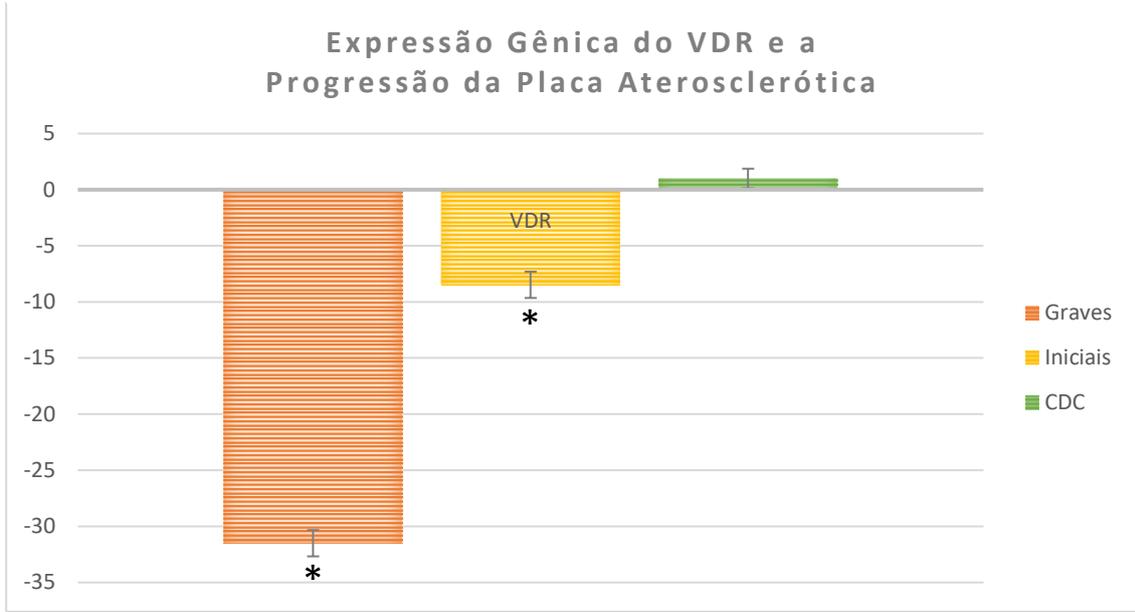
Fonte: o autor, 2018.

### 3.3.1 Perfil de Expressão do VDR e os Graus de Lesões Ateroscleróticas

Ao comparar a expressão gênica do VDR entre os diferentes graus de lesão aterosclerótica e os indivíduos saudáveis, verificou-se que pacientes com lesões graves expressam este gene -31,51 vezes que os indivíduos saudáveis ( $p = 6,024e^{-10}$ ). Quando comparada a expressão do VDR em pacientes com lesões iniciais com os mesmo indivíduos controles, também observa-se uma menor expressão desse gene em -8,48 vezes ( $p = 3,737e^{-11}$ ).

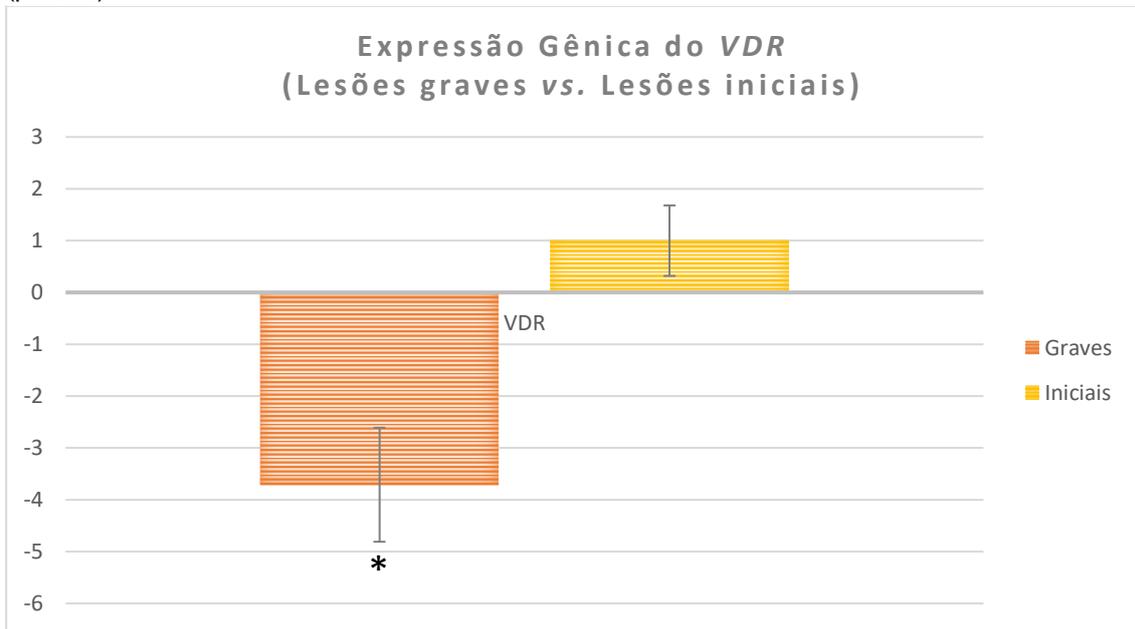
Quando comparada a expressão do VDR entre os diferentes graus de lesão (graves vs. iniciais) foi possível verificar que pacientes com lesões graves apresentam -3,71 vezes níveis de mRNA do VDR quando comparados aos pacientes com lesões iniciais ( $p = 0,007$ ).

**Gráfico 8:** Gráfico apresentando níveis de mRNA do gene VDR de acordo com o grau de lesão aterosclerótica, CDC: Controles. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).



Fonte: o autor, 2018.

**Gráfico 9:** Gráfico comparando níveis de mRNA do gene VDR de pacientes com lesões ateroscleróticas graves vs. aqueles com lesões iniciais. \* Valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).



Fonte: o autor, 2018.

### 3.3.2 Perfil de Expressão Gênica do VDR

A  $VD_3$  atua por meio da ligação ao seu receptor, o VDR, e desta forma realiza diversas atividades da cardioproteção, desde a manutenção de um perfil lipídico mais favorável ao indivíduo até a modulação do sistema imune (KASSI et al., 2013). Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa dos níveis de mRNA do *VDR* em pacientes com aterosclerose, comparado à indivíduos saudáveis. Verificamos ainda que pacientes com lesões mais graves apresentam menor expressão deste gene quando comparados aos pacientes com lesões iniciais. Corroborando com nossos achados, estudos realizados em macacos por Schnatz et al., em murinos por Gupta et al. e Schmidt et al., verificaram o mesmo perfil de expressão gênica, no qual quanto maior e mais grave a extensão da lesão aterosclerótica, menor a expressão do *VDR* (GUPTA et al., 2012; SCHMIDT et al., 2012; SCHNATZ et al., 2012).

Nossos resultados reforçam a importância da vitamina D e do VDR na inibição do desenvolvimento da placa aterosclerótica e na progressão da lesão. Os mecanismos pelos quais atua a vitamina D na prevenção à lesão aterosclerótica ainda não estão bem esclarecidos. Entretanto, a sua atuação desde a inibição dos fatores de risco ao desenvolvimento desta patologia como a diabetes, hipertensão e dislipidemia, até a atuação na imunomodulação da formação da placa aterosclerótica aumentando a resposta Th2 e inibindo Th1, alterando o fenótipo do macrófago de M1 para M2 ou ainda modulando a ativação do inflamassoma deixam claro o papel fundamental desta molécula e do seu receptor na cardioproteção (AWAD; ALAPPAT; VALERIO, 2012; KASSI et al., 2013; LI, 2012; OH et al., 2009; STRANGE; SHIPMAN; RAMACHANDRAN, 2015; TULK et al., 2015).

O motivo pelo qual indivíduos com aterosclerose apresentam menor expressão deste gene ainda não foi solucionado. Não está claro se a menor expressão do gene

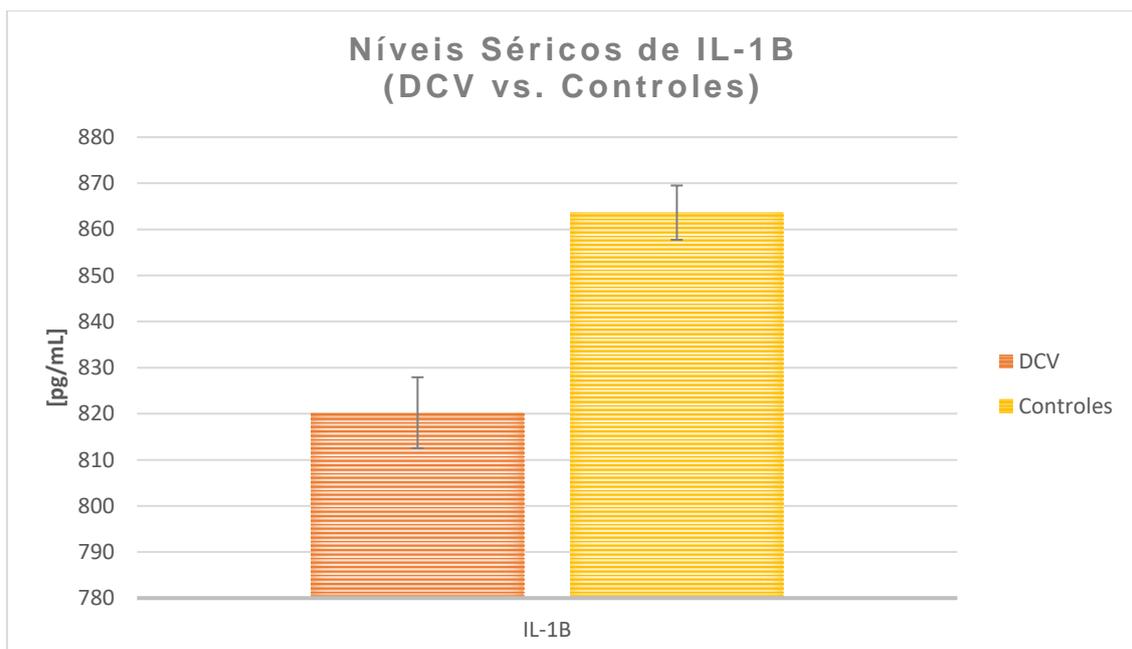
contribui com o desenvolvimento da aterosclerose, ou se há uma repressão da expressão deste gene como consequência da aterosclerose. A primeira hipótese é a mais aceita, visto que a própria vitamina D é quem regula a expressão do *VDR* (WANG; ZHU; DELUCA, 2012) e a deficiência deste hormônio é considerada uma pandemia (HOLICK et al., 2011).

### 3.4 ANÁLISES SOROLÓGICAS

#### 3.4.1 Níveis Séricos da IL-1 $\beta$

Usando a metodologia do ELISA foram dosados os níveis séricos da citocina IL-1 $\beta$  em pacientes com aterosclerose (n=40; 820,2pg/mL) e indivíduos controle (n=20; 863,6pg/mL). Após realização do teste de normalidade e do teste paramétrico *T-Student*, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,281).

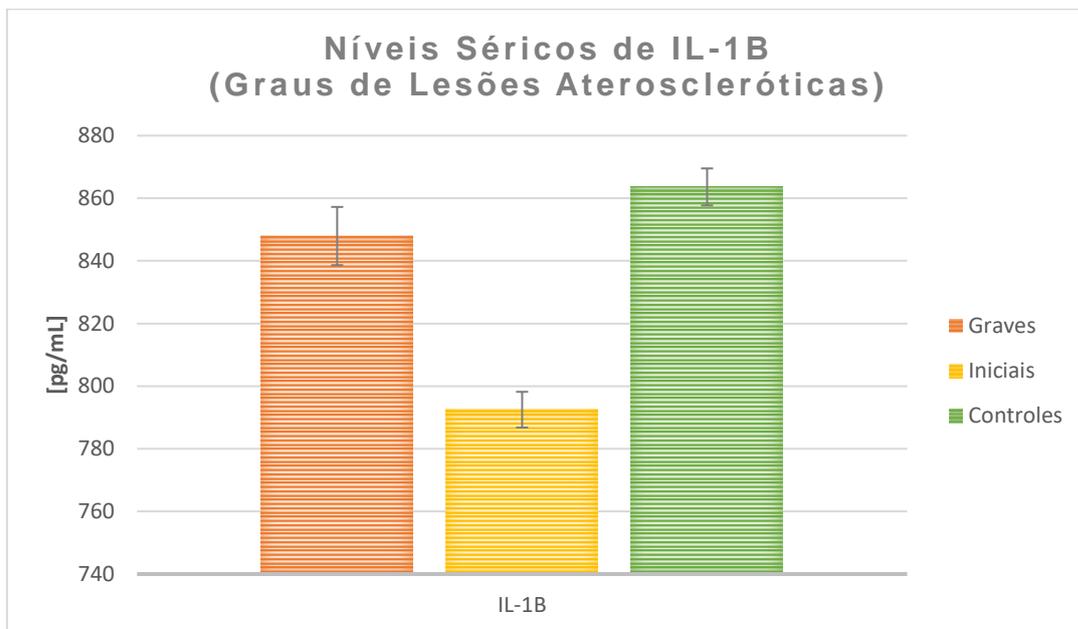
**Gráfico 10:** Gráfico apresentando níveis séricos de IL-1B em pacientes com aterosclerose (DCV) e indivíduos saudáveis (CDC).



Fonte: o autor, 2018.

Quando realizada a estratificação do grupo de pacientes de acordo com a gravidade da lesão aterosclerótica, também não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes com lesões graves (n=20; 847,9pg/mL), iniciais (n=20; 792,5pg/mL) e o grupo controle (n=20; 863,6pg/mL), com valores de  $p=0,374$  (graves vs. iniciais),  $p=0,790$  (graves vs. controles),  $p=0,091$  (iniciais vs. controles).

**Gráfico 11:** Gráfico apresentando níveis séricos de IL-1B de acordo com o grau de progressão da lesão aterosclerótica.



Fonte: o autor, 2018.

### 3.4.2 Níveis Séricos da IL-1 $\beta$ e Aterosclerose

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pro-inflamatória que para desempenhar seu papel requer uma pré-ativação pela caspase-1 (MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011). Nossos resultados mostraram que os níveis séricos dessa citocina apresentavam-se menores em pacientes com lesões iniciais quando comparado aos casos mais graves e aos

controles, entretanto os dados não foram estatisticamente significativos ( $p>0,05$ ). Os resultados encontrados por Lee et al. os quais foi verificado menor níveis séricos de IL-1 $\beta$  em pacientes com lesões iniciais (LEE et al., 2017), corroboram com nossos achados, entretanto também não obtiveram significância estatística na análise. Os inúmeros fatores que influenciam os níveis séricos desta citocina dificultam a interpretação dos resultados, com isso mais estudos são necessários para investigar seu perfil de ativação na aterosclerose e na progressão da lesão.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo nós avaliamos como apresentavam-se as diferentes vias de ativação da piroptose na aterosclerose e na progressão da lesão, assim como o perfil de expressão do *VDR*.

Em nosso trabalho foi relatado pela primeira vez o aumento da expressão do gene *NLRC4* em pacientes com aterosclerose ressaltando a importância deste gene na resposta inflamatória e adicionando um papel na formação da placa aterosclerótica.

O aumento da expressão do *NLRP1* o resalta como um importante marcador frente ao início da formação da placa aterosclerótica, visto que esse encontra-se mais expresso nas fases iniciais da aterosclerose. Assim como o *IL-1 $\beta$*  que se destaca também na fase inicial da lesão.

Os resultados encontrados nesse trabalho da expressão do *VDR* frente a aterosclerose e a progressão da placa são de extrema importância para o entendimento de como a VD atua na cardioproteção.

## REFERÊNCIAS

- AACHOUI, Y. et al. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 319–326, jun. 2013.
- AHMADI-ABHARI, S. et al. Physical Activity, Sedentary Behavior, and Long-Term Changes in Aortic Stiffness: The Whitehall II Study. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 8, p. e005974, 2017.
- ALIE, N. et al. Clinical Medicine Insights : Cardiology Evaluation of Atherosclerosis and Inflammation. v. 8, p. 13–21, 2014.
- ANDRADE, C. M. Avaliação do efeito anti-aterogênico dos fitoestrógenos na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais humanas Camila Marques de Andrade Ribeirão Preto Avaliação do efeito anti-aterogênico dos fitoestrógenos na expressão de moléculas de adesão. 2009.
- AWAD, A. B.; ALAPPAT, L.; VALERIO, M. Vitamin D and Metabolic Syndrome Risk Factors: Evidence and Mechanisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 2, p. 103–112, 2012.
- BERGSBAKEN, T.; COOKSON, B. T. Macrophage Activation Redirects Yersinia-Infected Host Cell Death from Apoptosis to Caspase-1-Dependent Pyroptosis. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. e161, 2007.
- BLEDA, S. et al. NLRP1 inflammasome, and not NLRP3, is the key in the shift to proinflammatory state on endothelial cells in peripheral arterial disease. **International Journal of Cardiology**, v. 172, n. 2, p. e282–e284, mar. 2014.
- BLEDA, S. et al. Elevated levels of triglycerides and vldl-cholesterol provoke activation of nlrp1 inflammasome in endothelial cells. **International Journal of Cardiology**, v. 220, p. 52–55, out. 2016a.
- BLEDA, S. et al. Effect of Simvastatin Treatment on “In Vitro” NLRP1 Inflammasome Expression in Peripheral Arterial Disease. **Annals of Vascular Surgery**, v. 36, p. 260–264, out. 2016b.
- BROZ, P. et al. Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. **Cell Host & Microbe**, v. 8, n. 6, p. 471–483, dez. 2010.
- BUONO, C. et al. Fluorescent pegylated nanoparticles demonstrate fluid-phase pinocytosis by macrophages in mouse atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, p. 1373–1381, 2009.
- CASTILHO, G. et al. ER stress is associated with reduced ABCA-1 protein levels in macrophages treated with advanced glycated albumin – Reversal by a chemical chaperone. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 7,

p. 1078–1086, jul. 2012.

CHARNEY, L. H.; VASCULAR, R. B. Macrophages in atherosclerosis : a dynamic balance. v. 13, n. 10, p. 709–721, 2015.

CHAVARRÍA-SMITH, J.; VANCE, R. E. The NLRP1 inflammasomes. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 22–34, maio 2015.

CHEN, K. et al. ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: A novel pathway of diabetic nephropathy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 5, p. 932–943, maio 2013.

CHENG, J. J. B. J. et al. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7711–7715, 2004.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: Metabolism. **Endocrinology And Metabolism**, v. 39, n. 2, p. 243–253, 2011.

CUNNINGHAM, K. S.; GOTLIEB, A. I. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. **Laboratory Investigation**, v. 85, n. 1, p. 9–23, 2005.

D'OSUALDO, A. et al. Transcription Factor ATF4 Induces NLRP1 Inflammasome Expression during Endoplasmic Reticulum Stress. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130635, 18 jun. 2015.

DAGENAIS, M.; SKELDON, A.; SALEH, M. The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 5–12, 11 jan. 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 25 jun. 2007.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907–1916, 1 abr. 2005.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1812–1825, nov. 2006.

GISTERÅ, A.; HANSSON, G. K. The immunology of atherosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 6, p. 368–380, 2017.

GRUYTER, D. et al. Vitamin D metabolism in human adipose tissue: could it explain low vitamin D status in obesity? **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, p. 1–19, 2017.

GUPTA, G. K. et al. Decreased Expression of Vitamin D Receptors in Neointimal Lesions following Coronary Artery Angioplasty in Atherosclerotic Swine. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42789, 6 ago. 2012.

- HANSSON, G. K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p. 1685–1695, 21 abr. 2005.
- HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nature immunology**, v. 12, n. 3, p. 204–12, 2011.
- HAUSSLER, M. R. et al. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D 3: Genomic and non-genomic mechanisms. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 543–559, 2011.
- HIRATA, M. et al. 22-Oxacalcitriol prevents progression of endothelial dysfunction through antioxidative effects in rats with type 2 diabetes and early-stage nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, n. 5, p. 1166–1174, 2013.
- HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, 2011.
- HU, Z. et al. Structural and biochemical basis for induced self-propagation of NLR4. **Science**, v. 350, n. 6259, p. 399–404, 23 out. 2015.
- ISAIA, G.; DI STEFANO, M.; BERGUI, S. The pleiotropic actions of vitamin D. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 3, n. 1, p. 35–42, 2006.
- JONES, G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 582–586, 2008.
- KAMEN, D. L.; TANGPRICHA, V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: Modulation of innate and autoimmunity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 5, p. 441–450, 2010.
- KASSI, E. et al. Role of vitamin D in atherosclerosis. **Circulation**, v. 128, n. 23, p. 2517–2531, 2013.
- KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117–121, 16 out. 2011.
- KONG, F. et al. Atorvastatin suppresses NLRP3 inflammasome activation via TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling in PMA-stimulated THP-1 monocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 167–172, ago. 2016.
- KOSZEWSKI, N. J.; HERBERTH, J.; MALLUCHE, H. H. Retinoic acid receptor gamma 2 interactions with vitamin D response elements. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 120, n. 4–5, p. 200–207, 2010.
- LABBÉ, K.; SALEH, M. Cell death in the host response to infection. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 9, p. 1339–1349, 20 set. 2008.

- LEE, B.-N.-R. et al. Upregulation of interleukin-1 $\beta$  production by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in activated human macrophages. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 3, p. 2193–2201, 17 mar. 2011.
- LEE, J. et al. Study of the NLRP3 inflammasome component genes and downstream cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus with carotid atherosclerosis. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 217, 18 dez. 2017.
- LEEMANS, J. C.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. **Immunological Reviews**, v. 243, n. 1, p. 152–162, set. 2011.
- LEI, H. WEI et al. Neuropsychiatric involvement in lupus is associated with the Nogo-a/NgR1 pathway. **Journal of Neuroimmunology**, v. 311, p. 22–28, 2017.
- LI, Y. C. Vitamin D : roles in renal and cardiovascular protection. v. 21, n. 1, p. 72–79, 2012.
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1135–1143, 2002.
- LIU, J. Reduced Macrophage Apoptosis Is Associated With Accelerated Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Null Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 3, p. 320–331, 21 out. 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LOPES MARQUES, C. The Importance of vitamin D levels in autoimmune disease. **Bras J Rheumatol**, v. 50, n. 1, p. 67–80, 2010.
- LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 4, p. 189–195, ago. 2011.
- LOU, Y.-R. et al. 25-Hydroxyvitamin D3 induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Scientific reports**, v. 7, n. October 2016, p. 42816, 2017.
- MACCALLINI, C.; MOLLICA, A.; AMOROSO, R. The Positive Regulation of eNOS Signaling by PPAR Agonists in Cardiovascular Diseases. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, p. 1–9, 2017.
- MARIATHASAN, S. et al. Innate immunity against Francisella tularensis is dependent on the ASC/caspase-1 axis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 8, p. 1043–1049, 17 out. 2005.
- MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 1, p. 10–22, 15 jan. 2007.
- MARUOTTI, N.; CANTATORE, F. P. Vitamin D and the immune system. **Journal of**

**Rheumatology**, v. 37, n. 3, p. 491–495, 2010.

MENDIS, S. Global progress in prevention of cardiovascular disease. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, v. 67, n. 1, p. S32–S38, 2017.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; MENDIS S; PUSKA P; NORRVING B EDITORS. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. **Organization**, 2011.

MIAO, E. A. et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 7, p. 3076–3080, 16 fev. 2010.

MIAO, E. A.; RAJAN, J. V.; ADEREM, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. **Immunological Reviews**, v. 243, n. 1, p. 206–214, set. 2011.

MILLER, Y. I. et al. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1561–1568, 2003.

MOLOFSKY, A. B. et al. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts Legionella pneumophila infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 4, p. 1093–1104, 17 abr. 2006.

MOORE, K. J.; TABAS, I. Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341–355, abr. 2011.

MOREIRA, R. O. et al. Perfil Lipídico de Pacientes com Alto Risco para Eventos Cardiovasculares na Prática Clínica Diária. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica**, v. 50, n. 3, p. 481–489, 2006.

NAGHAVI, M. et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 385, n. 9963, p. 117–171, 2015.

O'NEILL, L. A.; SHEEDY, F. J.; MCCOY, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 163–175, 18 mar. 2011.

OH, J. et al. 1,25(OH) 2 vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. **Circulation**, v. 120, n. 8, p. 687–698, 2009.

PENTIKÄINEN, M. O. et al. Modified LDL - Trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. **Journal of Internal Medicine**, v. 247, n. 3, p. 359–370, 2000.

QUEEN, L. R. et al. Mechanisms underlying beta2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. **The Journal of physiology**, v. 576, n. Pt 2, p. 585–94, 2006.

RANDOLPH, G. J. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 114, n. 11, p. 1757–1771, 2014.

RAYNER, K. J. Cell Death in the Vessel Wall. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 37, n. 7, p. e75–e81, 21 jul. 2017.

RIEK, A. E. et al. Vitamin D suppression of endoplasmic reticulum stress promotes an antiatherogenic monocyte/macrophage phenotype in type 2 diabetic patients. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 46, p. 38482–38494, 2012.

ROBBINS, C. S. et al. Local proliferation domina. v. 19, n. 9, p. 1166–1172, 2014.

ROBERTSON, A. K. L.; HANSSON, G. K. T cells in atherogenesis: For better or for worse? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 11, p. 2421–2432, 2006.

ROMBERG, N.; VOGEL, T. P.; CANNA, S. W. NLR4 inflammasomopathies. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 17, n. 6, p. 398–404, dez. 2017.

SCHMIDT, N. et al. Vitamin D Receptor Deficiency and Low Vitamin D Diet Stimulate Aortic Calcification and Osteogenic Key Factor Expression in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35316, 20 abr. 2012.

SCHNATZ, P. F. et al. The quantification of vitamin D receptors in coronary arteries and their association with atherosclerosis. **Maturitas**, v. 73, n. 2, p. 143–147, out. 2012.

SHAW, P. J.; MCDERMOTT, M. F.; KANNEGANTI, T.-D. Inflammasomes and autoimmunity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 2, p. 57–64, fev. 2011.

SHEN, J. et al. Caspase-1 recognizes extended cleavage sites in its natural substrates. **Atherosclerosis**, v. 210, n. 2, p. 422–429, jun. 2010.

SKALÉN, K. et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. **Nature**, v. 417, n. 6890, p. 750–4, 2002.

SOARES, J. L. S. et al. Gain-of-function variants in NLRP1 protect against the development of diabetic kidney disease: NLRP1 inflammasome role in metabolic stress sensing? **Clinical Immunology**, 2017.

STRANGE, R. C.; SHIPMAN, K. E.; RAMACHANDRAN, S. Metabolic syndrome: A review of the role of vitamin D in mediating susceptibility and outcome. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 7, p. 896–911, 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010.

TULK, S. E. et al. Vitamin D 3 Metabolites Enhance the NLRP3-Dependent Secretion

of IL-1 $\beta$  From Human THP-1 Monocytic Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 5, p. 711–720, maio 2015.

VANAJA, S. K.; RATHINAM, V. A. K.; FITZGERALD, K. A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 5, p. 308–315, maio 2015.

WALSKI, M. et al. Ultrastructural alterations of endothelium covering advanced atherosclerotic plaque in human carotid artery visualised by scanning electron microscope. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4 I, p. 713–723, 2002.

WANG, Q. et al. Vitamin D Inhibits COX-2 Expression and Inflammatory Response by Targeting Thioesterase Superfamily Member 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11681–11694, 25 abr. 2014.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 123–133, 2012.

WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. **World Health**, p. 176, 2014.

XU, Y.-J. et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 476, p. 28–37, jan. 2018.

YAN, S. et al. Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Factors in the Retinas of Diabetic Rats. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

YANG, C.-S. et al. Small heterodimer partner interacts with NLRP3 and negatively regulates activation of the NLRP3 inflammasome. **Nature Communications**, v. 6, p. 6115, 6 fev. 2015.

YANG, X. Inflammasomes: sensors of metabolic stresses for vascular inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v. 18, n. 2, p. 638, 2013.

YIN, Y. et al. Early Hyperlipidemia Promotes Endothelial Activation via a Caspase-1-Sirtuin 1 Pathway Significance. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 4, p. 804–816, abr. 2015.

YOUNG, M. P.; FEBBRAIO, M.; SILVERSTEIN, R. L. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 1, p. 136–145, 2009.

YU, S. et al. Statin protects the heart against ischemia-reperfusion injury via inhibition of the NLRP3 inflammasome. **International Journal of Cardiology**, v. 229, p. 23–24, fev. 2017.

ZHAO, Y. et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 596–600, 14 set. 2011.

ZHENG, Y.; GARDNER, S. E.; CLARKE, M. C. H. Cell Death, Damage-Associated Molecular Patterns, and Sterile Inflammation in Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 12, p. 2781–2786, 1 dez. 2011.

## APÊNDICE A – TCLE



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA



### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convidamos o (a) Sr. (a): \_\_\_\_\_ para participar como voluntário (a) da pesquisa : “**Avaliação de fatores genéticos associados à Doenças Cardiovasculares**” que está sob a responsabilidade da pesquisadora Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, setor de Biologia Molecular, Recife - PE - CEP: 50670-901, telefone para contato: 2126-2501 (inclusive ligações a cobrar), email: [e.a.borborema@gmail.com](mailto:e.a.borborema@gmail.com). Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade. O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores. As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (questionário e material biológico), ficarão armazenados em pastas de arquivo e em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos e após esse prazo o material será devidamente descartado.

#### **ASPECTOS DA PESQUISA:**

**Objetivos:** O material coletado será utilizado para análises de DNA, RNA, níveis séricos de vitamina D e de citocinas. O objetivo principal desse projeto é de avaliar qual a participação da vitamina D nos pacientes com Aterosclerose. A sua participação será no momento da abordagem dentro do ambulatório de atendimento médico, podendo futuramente ser recrutado para nova coleta de dados.

**Riscos:** Para este estudo é necessário a coleta de informações através de questionário que poderá contar perguntas que podem causar algum constrangimento ao voluntário, cabendo ao mesmo se recusar a responder a pergunta caso julgue necessário. Para este estudo também é necessário coletar amostras do sangue periférico. Será coletado também 10 ml de sangue em um tubo contendo anticoagulante EDTA (Ácido etilenodiamino tetraacético) e outro seco, podendo ocorrer uma leve picada ou hematoma (mancha arroxeadada - no local da punção). Como forma de minimizar os riscos, as coletas serão feitas por profissionais competentes e devidamente treinados. Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia dos voluntários.

**Benefícios:** Como benefícios indiretos, o presente projeto poderá contribuir para o entendimento de como a Vitamina D pode atuar frente ao processo aterosclerótico. O projeto ainda poderá trazer benefícios no que diz respeito ao cuidado com doenças cardiovasculares, principal causa de mortes por doenças de notificação não compulsória. Se confirmada a hipótese de que níveis séricos baixos de vitamina D ou mesmo alterações genéticas no seu receptor, atuam de forma no processo inflamatório formador da placa aterosclerótica, pode-se gerar um futuro marcador de risco e um potencial alvo terapêutico.

O (a) Sr (a). tem o direito de ser mantido(a) atualizado(a) sobre os resultados parciais da pesquisa, e caso seja solicitado, daremos todas as informações que solicitar. Nós nos comprometemos a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível sua identificação. Se o (a) senhor (a) concordar em colaborar voluntariamente com a pesquisa e se não tiver nenhuma dúvida, gostaríamos que assinasse este termo. Mesmo assinando, o (a) senhor (a) poderá recusar e/ou retirar o consentimento de participar da pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para ambas as partes. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

Pesquisador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito do que li ou do que foi lido para mim, descrevendo o estudo: "**AVALIAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS À DOENÇAS CARDIOVASCULARES**". Ficaram claros quais são os propósitos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, benefícios e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura:

Voluntário: \_\_\_\_\_

Testemunhas: 1 - \_\_\_\_\_

2 - \_\_\_\_\_

3 - \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B – MANUSCRITO I

**Manuscrito I – Artigo submetido ao periódico Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (Qualis B3) (*under review*)**

### **THE MEDICINAL PLANT *Commiphora leptophloeos* IS AN IMPORTANT ANTIOXIDANT AND NONCYTOTOXIC CAATINGA SPECIE**

Aline de Paula Caetano Pereira<sup>3§</sup>, Jorge José de Souza Pereira<sup>1,2§</sup>, Jannyson José Braz Jandu<sup>3</sup>, **Maria Eduarda de Albuquerque Borborema**<sup>1,2</sup>, Anna Paula de Oliveira Souza<sup>1</sup>, Natassia Javorski Rodrigues<sup>1,2</sup>, Paula Sandrin Garcia<sup>1,2</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>3</sup>, Jaqueline de Azevêdo Silva<sup>1,2\*</sup> and Maria Tereza dos Santos Correia<sup>3</sup>

#### **Affiliation**

1. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
2. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
3. Laboratory of Glycoproteins – Biochemistry Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

§ Authors equally contributed to this work.

\*Corresponding author:

Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva

E-mail: [j.azvedo@gmail.com](mailto:j.azvedo@gmail.com)

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife/Brazil CEP 50760-901

Telephone/Fax 55 81 21268484

## APÊNDICE C – MANUSCRITO II

Manuscrito II - Artigo a ser submetido ao periódico Tuberculosis (Qualis A2)

### VITAMIN D RECEPTOR (VDR) POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH DEVELOPMENT OF PULMONARY TUBERCULOSIS IN NORTHEASTERN BRAZIL

Jorge José de Souza Pereira<sup>1,2§</sup>, **Maria Eduarda Bezerra Borborema**<sup>1,2§</sup>, Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva<sup>1,2</sup>, Aline dos Santos Peixoto<sup>3</sup>, Michelle Rabello<sup>3</sup>, Sergio Crovella<sup>1,2</sup>, Haiana Charifker Schindler<sup>3</sup> and Jaqueline de Azevêdo Silva<sup>1,2\*</sup>

#### Affiliation

1. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
2. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
3. Oswaldo Cruz Foundation, Aggeu Magalhães Research Centre (FIOCRUZ/CPqAM), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

§ Authors equally contributed to this work.

\*Corresponding author:

Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva

E-mail: [j.azvedo@gmail.com](mailto:j.azvedo@gmail.com)

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife/Brazil CEP 50760-901

Telephone/Fax 55 81 21268484

## APÊNDICE D – MANUSCRITO III

Manuscrito III – Artigo a ser submetido ao periódico

### VITAMIN D RECEPTOR (*VDR*) GENE POLYMORPHISMS AND EXPRESSION PROFILE IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND ITS CLINICAL FEATURES IN NORTHEAST BRAZILIAN PATIENTS

#### Authors

Jaqueline de Azevêdo Silva<sup>a§</sup>, Suelen Cristina Lima<sup>b</sup>, Thiago Sotero Fragoso<sup>d</sup>,  
Catarina Addobbati<sup>a,b</sup>, Alexandre Domingues Barbosa<sup>b,c</sup>, **Maria Eduarda Bezerra de  
Albuquerque Borborema<sup>a,b</sup>**, Angela Luiza Branco Pinto Duarte<sup>c</sup>, Sergio Crovella<sup>a,b</sup>,  
Paula Sandrin-Garcia<sup>a,b</sup>

#### Affiliation

1. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
2. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
3. Division of Rheumatology, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Brazil.

\*Corresponding author:

Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva

E-mail: [j.azvedo@gmail.com](mailto:j.azvedo@gmail.com)

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife/Brazil CEP 50760-901

Telephone/Fax 55 81 21268484