

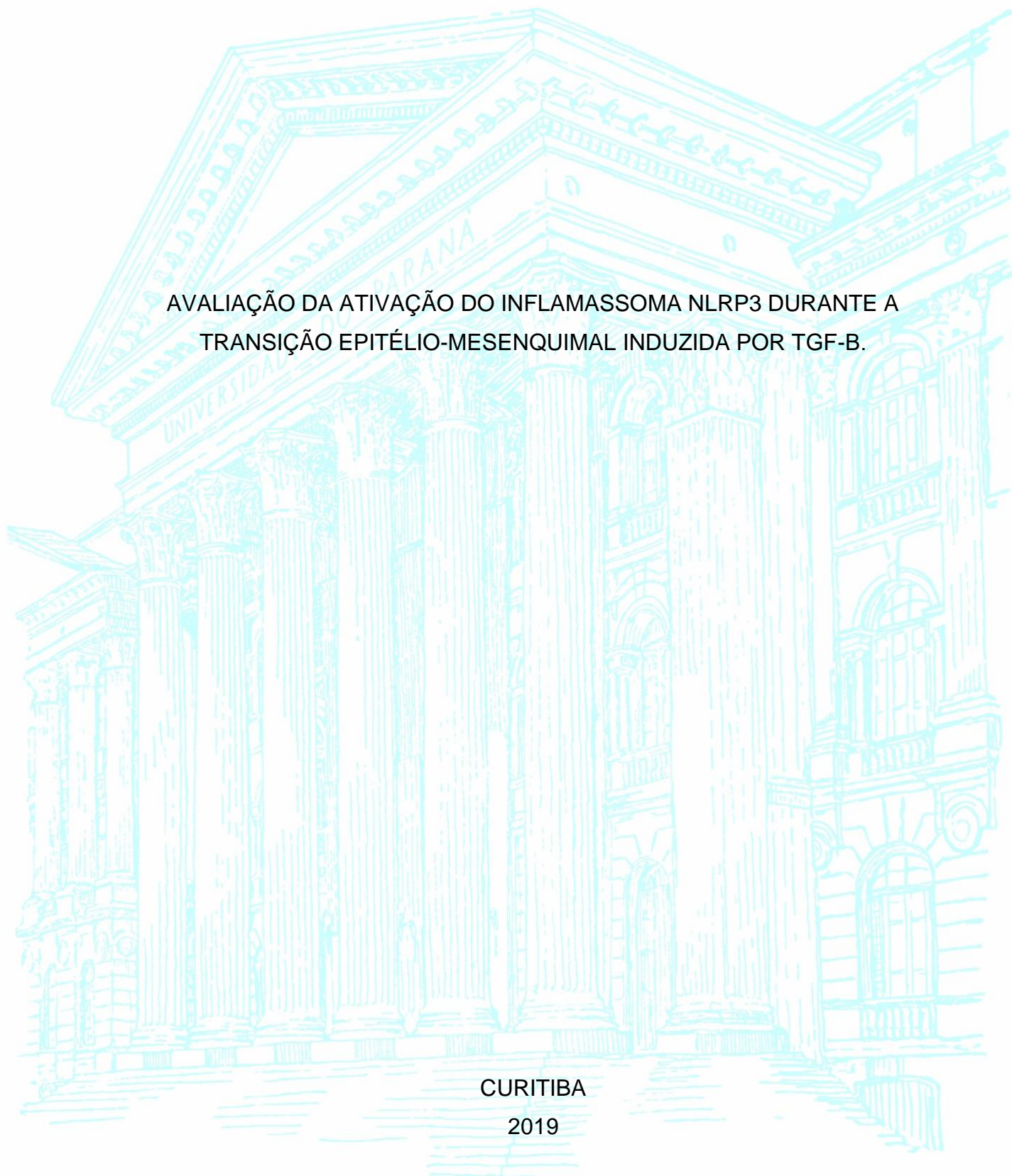
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MURILO HENRIQUE SATURNINO DE LIMA

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 DURANTE A  
TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL INDUZIDA POR TGF-B.

CURITIBA

2019



MURILO HENRIQUE SATURNINO DE LIMA

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 DURANTE A  
TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL INDUZIDA POR TGF-B.

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Tarcio Teodoro Braga

CURITIBA

2019

## TERMO DE APROVAÇÃO

MURILO HENRIQUE SATURNINO DE LIMA

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 DURANTE A  
TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL INDUZIDA POR TGF-B.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

---

Prof. Dr. Tarcio Teodoro Braga

Orientador – Departamento de Patologia Básica, UFPR

---

Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira

Departamento de Fisiologia, UFPR

---

Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 16 de dezembro de 2019.

*Em memória de meu avô que desde cedo se tornou um pai e de suas orientações e conselhos me fez chegar até este momento.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus familiares que com muita luta e suor derramado me permitiram dedicar aos estudos durante minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Tarcio Teodoro Braga pela oportunidade de me receber em sua linha de pesquisa e me orientar nos últimos 18 meses.

Aos professores Dr. Wanderson Duarte da Rocha, Dr. Silvio Marques Zanata pela oportunidade de realizar os experimentos deste trabalho em seus laboratórios fornecendo todo equipamento e matérias para realização do mesmo.

À Amani Alyaseer pela contribuição e auxílio durante a execução deste trabalho e pela amizade.

Aos meus amigos pessoais Rodrigo, Bianca, Ana Clara, Marielly, Joyce, Juliana, Alana e Victor pela companhia e apoio em momentos difíceis da graduação e durante a execução deste projeto.

A todos os membros dos laboratórios L.I.F.E, GFP, pelo auxílio, aprendizado e amizade.

**“Talento é acertar um alvo que ninguém acerta. Genialidade é acertar um alvo que ninguém vê” (Arthur Schopenhauer)**

## RESUMO

A fibrose pode ser definida pelo acúmulo de tecido conectivo fibroso, como os integrantes da matriz extracelular (MEC), na região de lesão ou de inflamação, o que leva ao mal funcionamento do órgão e possível morte celular. Dentre as vias relacionadas à fibrose, destaca-se a via do TGF- $\beta$ /Smad. Quando liberado, o TGF- $\beta$ 1 se liga ao receptor TGF- $\beta$ RII e inicia a cascata de sinalização que culmina no aumento de fatores de transcrição Smad. Os Smad2/3, quando fosforilados, formam um complexo com o Smad 4 e iniciam a expressão de genes da MEC, além de desencadear a transição epitélio-mesenquimal (TEM). Estudos nas últimas décadas ssuam proteína adaptadora ASC e a caspase-1. Uma vez ativado, o complexo do inflamassoma NLRP3 se oligomeriza e leva à ativação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e o IL-18. Há ainda grande controvérsia a respeito da simples presença do receptor NLRP3 ou da oligomerização do complexo do inflamassoma NLRP3 durante o desencadeamento da TEM. Nosso objetivo, portanto, é observar a formação do complexo do Inflamassoma após indução de TEM via TGF- $\beta$  em células renais tubulares. Para tal, células HK-2 serão transduzidas com as proteínas do inflamassoma NLRP3 e ASC marcadas com GFP e *Cerulean*, respectivamente. Posteriormente, a TEM será induzida por TGF- $\beta$ . Além da observação da oligomerização do complexo do inflamassoma NLRP3 por microscopia confocal, analisaremos por *western blotting* os marcadores de TEM, como e-caderina e  $\alpha$ -sma. Ademais, iremos deletar o fator de transcrição Smad3 via *crispr*.

**Palavras-Chave:** Fibrose, Inflamassoma, NLRP3, Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM), TGF- $\beta$ , Smad.

## ABSTRACT

Fibrosis can be defined by the accumulation of fibrous connective tissue, such as the extracellular matrix (ECM), in the region of injury or inflammation, which leads to organ malfunction and possible cell death. Among the fibrosis-related pathways, the TGF- $\beta$  / Smad pathway stands out. When released, TGF- $\beta$ 1 binds to the TGF- $\beta$ RII receptor and initiates the signaling cascade that culminates in the increase of Smad transcription factors. Smad2 / 3, when phosphorylated, forms a complex with Smad 4 and initiates expression of ECM genes, in addition to triggering the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Studies in the last decades have shown a relationship between EMT and inflammasome, a protein complex formed by a receptor of the NOD family (the NLRP3 as the most studied receptor), an ASC protein and caspase-1. Once activated, the NLRP3 inflammasome complex oligomerizes and leads to the activation of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-18. There is still some controversy regarding the simple presence of the NLRP3 receptor or the oligomerization of the NLRP3 inflammasome complex during the onset of EMT. Our aim, therefore, is to observe the formation of the inflammasome complex after induction of EMT via TGF- $\beta$  in tubular renal cells. To this end, HK-2 cells will be transfected with the GFP and Cerulean labeled NLRP3 and ASC inflammatory proteins, respectively. Subsequently, EMT will be induced by TGF- $\beta$ . In addition to the observation of the oligomerization of the NLRP3 inflammasome complex by confocal microscopy, we will analyze by western blotting the EMT markers, such as E-cadherin and  $\alpha$ -sma. In addition, we will delete the transcription factor Smad3 via *crispr*.

**Key Words:** fibrosis, inflammasome, NLRP3, EMT, TGF- $\beta$ , Smad.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação Inflamassoma e TGF durante a TEM. ....	27
Figura 2 - Fluxograma da Metodologia.....	28
Figura 3 - A. Célula MM55.K controle. B. Célula MM55.K com TEM induzida por TGF pós 48h. C. Western Blotting para marcadores de TEM (À esquerda E-Caderina, à direita $\alpha$ -SMA).....	33
Figura 4 - Sorting da população de células NLPR3 GFP <sup>+</sup> .....	34
Figura 5 - PCR de colônia das E.coli que receberam o plasmídeo Px-601 com a sequência guia da Smad3.....	35
Figura 6 – A. Resultado do sequenciamento. B. Consulta do software Blast.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

TEM - Transição Epitélio Mesenquimal

TGF- $\beta$  - *Transforming Growing Factor - Beta*

FSP-1 - *Fibronectin Specific Protein – 1*

$\alpha$ -SMA - *Alpha Smooth Muscle Actin*

NLRP3 - *NOD, LRR and pyrin domain-containing protein 3*

ASC - *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

## LISTA DE SÍMBOLOS

© - copyright

B – beta

$\alpha$  – alfa

$\gamma$  – gama

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
1.2.1 Objetivo geral .....	17
1.2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 FIBROSE</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO TGF-B/SMAD</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3 IL-1B</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4 SMAD</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (TEM)</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6 INFLAMASSOMA</b> .....	<b>22</b>
2.6.1 Ativação do Inflamssoma .....	23
2.6.2 Sinais promotores da oligomerização do Inflamassoma. ....	24
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 CÉLULAS</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2 KNOCKOUT SMAD3</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3 GENES DO INFLAMASSOMA E DO LENTIVIRUS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4 MINIPREP</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5 TRANSFEÇÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6 INDUÇÃO DE EMT VIA TGF-B</b> .....	<b>31</b>
<b>3.7 MICROSCOPIA CONFOCAL</b> .....	<b>31</b>
<b>3.8 WESTERN BLOTTING</b> .....	<b>32</b>
<b>4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>35</b>
<b>5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fibrose é uma característica decorrente de um quadro inflamatório persistente após um dano celular causado por um agente agressor químico, físico ou biológico, no qual há liberação de citocinas, como a IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ , que promovem o recrutamento de células do sistema imune e ativação de fibroblastos, que começam a síntese de componentes da matriz extracelular de forma exacerbada (Wynn e Ramalingam, 2012). O TGF- $\beta$  atua na célula alvo e se liga inicialmente ao receptor de TGF- $\beta$  do tipo 2 que, por sua vez, fosforila o receptor do tipo 1. Após essa fosforilação, proteínas Smad 2 e 3 são recrutadas e fosforiladas, formando um dímero capaz de atuar como fator de transcrição. Posteriormente, esse dímero interage com a Smad4 para formar um trímero que é direcionado ao núcleo e passa a transcrever genes responsáveis por produzir componentes da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, dentre outros (Neelisetty *et al.*, 2015).

A ativação dessa via é responsável por induzir a transformação de células epiteliais do tipo cuboide e com forte interação célula-célula para um formato celular denominado “*spindle-shaped*” e sem adesão célula-célula, típica de fibroblastos. Esta transformação é denominada transição epitélio-mesenquimal (TEM) e é caracterizada pela diminuição da expressão de genes que conferem características epiteliais, como a e-caderina e o aumento da expressão de genes de fibroblastos como FSP-1 e  $\alpha$ -SMA (Carew *et al.*, 2012).

O inflamassoma é um complexo proteico formado por um receptor da família NOD, uma proteína adaptadora ASC e a pro-caspase 1, sendo o componente mais estudado o NLRP3. Quando ativado, esse complexo tem a função de clivar as pró-formas das interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18 em suas formas ativas (Martinon *et al.*, 2002). Em 2013 Wang *et al.* inferiram que a TEM ocorre após tratamento com TGF- $\beta$  em células do túbulo renal de forma independente da formação do inflamassoma (Wang *et al.*, 2013). Por outro lado, Tian *et al.*, utilizando células epiteliais pulmonares, demonstraram que a indução da TEM leva ao aumento da expressão dos componentes do inflamassoma (Tian *et al.*, 2017). Além disso, Romero *et al.*, utilizando cristais de ácido úrico para induzir a TEM, também demonstraram que há aumento de expressão de NLRP3, aumento dos níveis do dímero Smad2/3, e, mais surpreendente, que há uma co-localização de ambos NLRP3 e Smad (Romero *et al.*, 2017). A relação entre inflamassoma e a TEM é, porém, controversa, especialmente

no que tange a dependência da formação do complexo inflamassoma para a ocorrência da TEM. Nossa hipótese é que o TGF- $\beta$  pode ativar o inflamassoma no contexto da TEM. Esperamos, portanto, investigar a interação entre NLRP3 e o complexo Smad durante a mudança de células epiteliais para o tipo fibroblastóide. Esperamos estudar, pela primeira vez, que o papel ativação do inflamassoma no contexto fibrótico.

## **1.1 JUSTIFICATIVA**

Sabe-se que o processo fibrótico ocorre através da TEM, um mecanismo celular iniciado pelo TGF- $\beta$ . Porém, ainda não é bem descrita a relação entre TEM e inflamassoma. Alguns dados na literatura demonstram que a TEM é independente do inflamassoma, ou seja, não é necessário que se forme o complexo do inflamassoma, mas apenas a presença do receptor NLRP3 para o desencadeamento da TEM. Uma melhor investigação da formação do complexo do inflamassoma NLRP3 após a indução de TEM e a modulação do complexo nos daria base para o entendimento e futuro tratamento de doenças fibróticas.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Observar a formação do complexo do Inflamassoma após indução de TEM via TGF- $\beta$  em células renais tubulares.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Gerar células epiteliais renais cujas moléculas relacionadas ao inflamassoma, NLRP3 e ASC, sejam marcadas por moléculas fluorescentes, e cujo Smad3 seja deletado;
- Analisar a formação do complexo inflamassoma em células epiteliais renais após indução da TEM, na presença e ausência de Smad3

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FIBROSE

A resolução da resposta inflamatória é o reparo do tecido, porém, se o dano persiste, leva ao processo cicatricial ou fibrótico. Tais processos diferem uma vez que o reparo tecidual ocorre após um estímulo lesivo em um curto período de tempo, enquanto na fibrose a lesão é necessariamente crônica, podendo levar a perda de função do órgão e até sua falência. A fibrose pode ser definida pelo acúmulo de tecido conectivo fibroso, como os integrantes da matriz extracelular (MEC), colágeno e fibronectina, na região de lesão ou de inflamação (Wynn e Ramalingam, 2012), o que leva ao mau funcionamento do órgão e possível morte celular. Esse mecanismo é observado em muitas doenças inflamatórias crônicas como, artrite reumatoide, fibrose pulmonar idiopática, doença de Cronh, doenças renais crônicas, e reconhecidas pela alta mortalidade e perda da qualidade de vida por esses pacientes, devido principalmente à falta de tratamentos específicos (Wynn e Ramalingam, 2012). A inflamação aguda pode levar a fibrose quando se torna persistente ou quando o agente agressor não é removido. Portanto, as estratégias estão voltadas à eliminação de tal agente, porém, nem todos são de fácil remoção, outros se desconhecem qual a origem e como neutralizá-lo, o que força à busca por alternativas na via de formação de tecido fibroso (Wynn e Ramalingam, 2012).

Os mediadores da inflamação são os responsáveis tanto por combater o antígeno quanto iniciar o remodelamento do tecido. Na inflamação crônica o papel central é executado pelos macrófagos (Fenyo e Gafencu, 2013). Essas células, oriundas principalmente de monócitos que saíram da circulação sanguínea e atingiram o tecido, se tornam células fagocíticas e secretoras de citocinas. A ativação dessas células leva a perfis diferentes aos macrófagos. A via clássica é disparada por produtos microbianos, INF- $\gamma$  liberados por linfócitos T e outros antígenos. Esse perfil de macrófagos, denominado M1, tem características pró-inflamatórias pela síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS), com função de destruir o invasor fagocitado e citocinas como IL-1, IL-23 e quimiocinas que estão envolvidas diretamente na inflamação. Além do IL-1, o TNF- $\alpha$  também está presente em uma variedade de distúrbios fibróticos. Alguns estudos mostram que a super expressão dessa molécula em camundongos leva a maior propensão ao desenvolvimento de fibrose pulmonar (Fujita et al., 2003). Ao longo do processo infeccioso, os macrófagos pró-inflamatórios se tornam macrófagos com perfil anti-inflamatório, devido à sua plasticidade. Tal

transição ocorre após a fagocitose de corpúsculos apoptóticos, cuja presença é indicativa de eliminação do agente agressor. O perfil M2 é ativado por via alternativa pela ação de citocinas como IL-4 e IL-13, produzidas por linfócitos T, mastócitos e eosinófilos. Esse perfil tem caráter anti-inflamatório e de reparo do tecido, o que culmina em fibrose pela ação de IL-10, TGF- $\beta$  e fatores de crescimento (Martinez e Gordon, 2014).

Compreender os mecanismos que levam à fibrose, bem como as vias em si pode auxiliar no desenvolvimento de tratamentos e drogas para tratar ou até reverter o quadro de fibrose. Em doenças renais crônicas, a fibrose é presente em estágios finais da doença, anterior a perda de função dos rins, assim como em fibrose pulmonar, hepática e outras. Entre as vias que determinam a fibrose estão TGF- $\beta$ /smads, Wnt/  $\beta$ -catenina, JNK e MAPKs (Furukawa et al., 2003; Yu et al., 2007; Lim et al., 2009; Sun et al., 2013; Maarouf et al., 2016; Sun et al., 2016).

## 2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO TGF-B/SMAD

Dentre essas, a que chama maior atenção dos pesquisadores é a via de TGF- $\beta$ /Smads como sendo a principal responsável por levar a fibrose renal (Sun *et al.*, 2016). As células epiteliais e do túbulo renal sintetizam TGF- $\beta$ 1, que por sua vez, se liga covalentemente a matriz extracelular (Huang *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2016). Quando liberado, o TGF- $\beta$ 1 se liga ao receptor TGF- $\beta$ II e inicia a cascata de sinalização dos fatores de transcrição Smad. Smad2/3, quando fosforilado após sinais desencadeados por TGF- $\beta$ 1, se complexa ao smad 4 para iniciar a expressão de genes que levam ao acúmulo da MEC e impede a sua degradação via transição epitélio-mesenquimal (TEM) e transição endotélio-mesenquimal (*EndoMT* do inglês *endothelial-mesenchymal transiction*) gerando o quadro fibrótico (Iwano *et al.*, 2002; Mariasegaram *et al.*, 2010; Loeffler e Wolf, 2015; Sun *et al.*, 2016).

Neelisetty e colaboradores mostraram que o bloqueio dos receptores TGF- $\beta$ II não reduz ou reverte a fibrose renal, o que indica que há outras moléculas e vias que coordenam o mecanismo fibrótico além da ligação do TGF- $\beta$  ao seu receptor (Neelisetty *et al.*, 2015). Outros estudos mostram a atividade pró-fibrotica de IL-1 $\beta$  desencadeada por em macrófagos. A IL-1 $\beta$ , portanto, induz EMT e síntese de miofibroblastos via TGF- $\beta$ , porém, esses mecanismos celulares não estão totalmente elucidados (Lorenz *et al.*, 2014).

### 2.3 IL-1B

O mecanismo pelo qual a IL-1 $\beta$  está envolvida na fibrose é complexo. A principal hipótese está na relação entre a citocina inflamatória e o TGF- $\beta$ . Segundo Luo et. al. a curta exposição de IL-1 $\beta$  inibe a ação do TGF- $\beta$  através da via NF- $\kappa$ B, e consequentemente, a via Smad, responsável pela transcrição dos genes codificadores do TGF- $\beta$ , torna-se inativa (Luo et al., 2009). Porém, essa situação é transitória devido a uma alteração no heterodímero do NF- $\kappa$ B de p65/p50 para p50/p50 24 horas após exposição a IL-1 $\beta$  (Luo et al., 2009). O novo heterodímero não é capaz de inativar Smad e assim, a exposição prolongada de IL-1 $\beta$  promove a expressão de TGF- $\beta$  via Smad (Lee et al., 2006; Luo et al., 2009). Esse dado confirma o primeiro achado em relação ao potencial da IL-1 $\beta$  em ativar TGF- $\beta$  proposto em 1994 por Yue et.al. em células do músculo vascular (Yue et al., 1994).

### 2.4 SMAD

Visto a relevância da sinalização por Smad pós-indução de TGF- $\beta$ , a deleção de Smad2 e Smad3 demonstrou diferenças na atividade de cada uma. A deficiência de Smad2 em camundongos geneticamente modificados nos domínios MH1 e MH2 da proteína causam inviabilidade do embrião no devido às más formações durante a gastrulação (Nomura e Li, 1998), MH1 é responsável pela ligação ao DNA a partir da sua porção N-terminal, já MH2 executa a heterodimereização, bem como a transativação. Deleções pós-gastrulação são viáveis porem apresentam diversas alterações como ciclopia, anormalidades craniais, entre outras (Heyer *et al.*, 1999). Sugerindo que a Smad2 tem importância durante o desenvolvimento embrionário. Outro fator ligado a Smad2 é a supressão tumoral quando esta é inativada (Hahn *et al.*, 1996). A função efetora de Smad2 ocorre quando após a ligação com a Smad4. A efetividade de Smad2 e Smad4 se dá em sua porção carboxi-terminal e a inibição da mesma está na porção amino-terminal que impede a formação do complexo Smad2/Smad4 (Hata *et al.*, 1997). Tal atividade é aumentada em alguns tumores em que ambas Smads carregam uma mutação em um resíduo de arginina na região amino-terminal (Hata *et al.*, 1997). Mesmo Smad2 contendo um domínio de ligação ao DNA, sua ação está relacionada à ligação com outros fatores de transcrição na regulação da expressão gênica estimulada pela via de sinalização TGF- $\beta$ /Smad.

A depleção de Smad3 não compromete a viabilidade do embrião, porém, causa inflamação crônica e deturpação do sistema imune, principalmente em relação às respostas imunes nas mucosas (Datto *et al.*, 1999). Os eventos da sinalização de TGF- $\beta$  passam pela fosforilação de seus receptores e ativação de duas Smads via fosforilação, sendo elas Smad2 e Smad3. Em algumas doenças fibróticas como as do fígado, apresentam alta expressão de Smad2 e Smad3 (Yao *et al.*, 2012). Porém, apenas Smad3 é importante do desenvolvimento da fibrose, devido à expressão de alguns genes relacionados a quadros fibróticos, como colágeno,  $\alpha$ -SMA e E-Caderina são dependentes de Smad3 (Medeiros *et al.*, 2004). Diferentemente da Smad2, Smad3 tem a função de se ligar diretamente nesses genes alvo.

Entre as Smads há poucas diferenças estruturais, porém, quanto à função tem se demonstrado certas divergências. Zhang *et al.* observou que o *knockout* de Smad2 em células hepáticas humanas gera fibrose via Smad3 pelo aumento da fosforilação, da translocação nuclear e pela ligação de Smad3 na região promotora do gene que codifica o colágeno tipo 1 (Zhang *et al.*, 2015).

## **2.5 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (TEM)**

Um dos mecanismos pelo qual as células epiteliais entram no processo fibrótico é conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM). A TEM tem participação fundamental no desenvolvimento embrionário, cicatrização, regeneração tecidual e fibrose. A TEM pode ser definida como uma alteração fenotípica das células epiteliais, cuja função é a manutenção da barreira física e formato é cúbico, para o fenótipo fibrótico, que tem função de deposição de matriz extracelular. Essa alteração é observada por biomarcadores como a e-caderina expressa em células epiteliais e  $\alpha$ -sma, expressa nos fibroblastos.

A TEM foi primariamente descrita no contexto da embriologia em 1989 por Elizabeth Hay, que observou, por micrografia eletrônica, a perda de características epiteliais e aparecimento de fibroblastos na palatogênese (Fitchett e Hay, 1989). A partir de então estudos sobre a TEM se ampliaram tanto no campo da embriologia como na oncologia e estudos sobre fibrose, e desses estudos resultou-se na definição de três tipos de TEM. A transição epitelial do tipo 1 está relacionada com células epiteliais primárias transitando para mesenquimais com o objetivo de implantação uterina e gastrulação, assim, essas células mesenquimais participam do desenvolvimento embrionário e da organogênese tornando-se células epiteliais

secundárias (Carew *et al.*, 2012). O tipo 2 ocorre em processos inflamatórios e fibrótico, presente em células epiteliais secundárias, ou seja, aquelas que formam o tecido dos órgãos sólidos. Na TEM do tipo 2, células epiteliais se tornam fibroblastos que depositam componentes de matriz extracelular levando à fibrose e, por consequência, à morte do tecido quando o agente iniciante da resposta inflamatória não é removido (Carew *et al.*, 2012). A TEM do tipo 3 tem uma característica peculiar na qual a transição não se dá para um tipo mesenquimal, como no caso dos fibroblastos, mas sim com características metastáticas em processos oncogênicos nos quais células que sofreram uma mutação necessitam de um mecanismo para se tornarem potencialmente metastáticas e invasoras, além de inibir os mecanismos de apoptose (Carew *et al.*, 2012).

## 2.6 INFLAMASSOMA

No ano de 2002 o grupo de pesquisa liderado pelo pesquisador Jurg Tschopp cunhou o termo “inflamassoma”, definido como um complexo protéico composto por receptores citosólicos da família Nod (do inglês, “*nucleotide-binding oligomerization*”) (Martinon *et al.*, 2002). Membros dessa família, denominados NLRs, possuem três domínios, sendo eles: um domínio rico em leucina (LRR, do inglês, *leucine-rich repeats*) que tem a função de receber o sinal do ligante, um domínio NACHT (também conhecido com NBD - do inglês, *nucleotide-binding domain*) com função estrutural, e um domínio efetor que recruta outras proteínas da família Nod para exercerem a função sinalizadora do oligômero formado (Proell *et al.*, 2008). Tais domínios garantem as funções de reconhecer padrões moleculares ligados ao patógeno (PAMPs), padrões moleculares ligados ao dano (DAMPs), bem como outros fatores que levam à formação de oligômeros (Kim *et al.*, 2016). Há subfamílias de NLRs que diferem entre si quanto ao domínio efetor que são Acidic, BIR, CARD e *Pyrin* (Negróni *et al.*, 2018), sendo alguns componentes dos dois últimos, integrantes dos inflamassomas, como por exemplo, os NLRC que contém o domínio “card” e o NLRP com domínio *pyrin*. Os inflamassomas constituídos por NLRCs, por exemplo, não se ligam a proteína adaptadora ASC, mas se ligam diretamente à caspase-1 pela interação *card-card* uma vez que tal caspase contém este domínio (Jha e Ting, 2009). Os resultados do trabalho do grupo do Professor Tschopp trouxeram a primeira noção de um complexo contendo as caspases inflamatórias ligadas à proteína adaptadora

ASC e ao receptor citosólico do NALP1, com a função de ativar a caspase pró-inflamatória (Martinon *et al.*, 2002).

A subfamília cujo domínio é *Pyrin* (NLRPs) são as principais formadoras do inflamassoma entre eles estão NLRP1, NLRP3. Quando ativados por um ligante de origem endógena ou microbiana, as proteínas se ligam entre si e interagem com uma proteína adaptadora ASC, que por sua vez se liga à caspase-1 até então inativa. Uma vez clivada, a caspase-1 se torna ativa e torna-se capaz de clivar precursores protéicos em resíduos de aspartato, cujos principais representantes são a clivagem das formas inativas das citocinas IL- $\beta$  e IL-18, tornando-as ativas. Além de conter *pyrin*, a proteína ASC contém também um domínio CARD, responsável pela interação com a forma inativa de caspase-1. Há outras subfamílias de receptores citosólicos que compõem os inflamassomas. O membro da família PYHIN AIM2 (do inglês, “*absent in melanoma*”) contém um domínio “*pyrin*” e uma sequência de nucleotídeos capazes de se ligar a ácidos nucleicos endógenos ou exógenos como vírus e bactérias (Schattgen e Fitzgerald, 2011; De Zoete *et al.*, 2014). Devido ao domínio “*pyrin*” o AIM2 também é capaz de se ligar a proteína adaptadora ASC para formar a plataforma do inflamassoma (De Zoete *et al.*, 2014).

### 2.6.1 Ativação do Inflamassoma

A ativação do inflamassoma NLRP3 é dividida em canônica e não canônica. A primeira etapa da via canônica refere-se à resposta aos receptores toll-like (TLR) e receptores de citocinas que juntos promovem a transcrição das formas pró-IL1 e pró-IL18 bem como a do receptor NLRP3 todas via NF- $\kappa$ B, assim, essa primeira etapa confere a fase de transcrição da via canônica de ativação do inflamassoma (Swanson *et al.*, 2019). A segunda etapa é a fase de oligomerização do complexo, na qual há o recrutamento da proteína adaptadora ASC e pró-caspase1 (Swanson *et al.*, 2019). Subsequente o complexo é ativado e executa sua função de converter as formas pró-IL1 $\beta$  e pró-IL18 em suas formas ativas (Pellegrini *et al.*, 2017).

A via não canônica é relacionada à via dependente de caspase-11. As bactérias gram negativas tem a capacidade de se ligar e ativar as vias TLR4-Myd88 e TRIF (do inglês, *toll-IL1 receptor homology domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ). A consequência da ativação dessas vias é uma translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B para o núcleo promovendo a transcrição dos genes referentes ao NLRP3, IL-1 $\beta$ , IL-18 e os fatores de regulação de interferons 3 e 7 (IRF3 e IRF7). O

complexo IRF3 e IRF7 aumentam a expressão de IFN $\alpha\beta$  que ao se ligar em seus respectivos receptores de forma autócrina ativam a via de sinalização JAK/STAT levando a transcrição dos genes da capsase-11 (Pellegrini et al., 2017). Os estímulos que promovem a oligomerização serão descritos adiante.

Observa-se um aumento no número de estudos que envolvem alterações do metabolismo e a atividade do inflamassoma NLRP3 (Sanman et al., 2016; Próchnicki e Latz, 2017). O acompanhamento do perfil metabólico da célula pode ser um melhor indicativo sobre a ativação do inflamassoma em relação à diminuição da concentração de K<sup>+</sup>, como será discutido adiante. O perfil metabólico da célula tem duas vias importantes, a glicolítica e a fosforilação oxidativa. Ambas podem estar envolvidas com a ativação ou inibição de NLRP3. Estudos recentes mostram que a preservação da via glicolítica promove a ativação do inflamassoma. Xie e colaboradores demonstraram o papel da piruvato kinase (PKM2) como modulador do fator de tradução PKR para ativar a via canônica do inflamassoma em um modelo de sepse (Xie et al., 2016). Outros estudos mostram que a desregulação da via glicolítica ativa o inflamassoma (Sanman et al., 2016). Por outro lado, Sanman et al. mostra que alterações do NADPH e a infecção por *Salmonella typhimurium* sequestram a glicose da célula hospedeira e promove a ativação do inflamassoma (Sanman et al., 2016). Foi demonstrado também que a geração de ânions superóxido após a oxidação de ácidos graxos pela ação de enzimas como a NADPH é capaz de ativar NLRP3 (Próchnicki e Latz, 2017).

### **2.6.2 Sinais promotores da oligomerização do Inflamassoma.**

A ativação do inflamassoma não é dada apenas pela ligação ao seu ligante, mas há eventos intracelulares capazes de aumentar a expressão do receptor e promover a formação do oligômero (Swanson *et al.*, 2019). Eventos celulares levam a formação e ativação do inflamassoma NLRP3, tais como efluxo de K<sup>+</sup>, sinalização com Ca<sup>2+</sup>, espécies reativas de oxigênio (ROS), danos mitocondriais e ruptura de lisossomos.

O entendimento de que o K<sup>+</sup> exerce papel na ativação do NLRP3 se deu através de estudos com ionóforos de potássio nos quais houve maturação de IL-1 $\beta$  após estímulo com LPS em macrófagos murinos (Perregaux e Gabel, 1994). Além disso, altas concentrações de K<sup>+</sup> extracelular bloqueiam a ativação do inflamassoma NLRP3 (Franchi *et al.*, 2007; Pétrilli *et al.*, 2007). O efluxo de potássio acontece sob

estímulo de NLRP3 e o baixo nível de  $K^+$  no citosol é suficiente para ativar o inflamassoma (Muñoz-Planillo *et al.*, 2013). A consequência de tal efluxo é a diminuição da concentração de potássio intracelular e tem sido proposto que esse efeito é vital para ativação de NLRP3. Entretanto, o mecanismo relacionado ao balanço da concentração de potássio intracelular e extracelular capaz de ativar o inflamassoma é pouco conhecido (He *et al.*, 2016).

Estudos sugerem também a ativação do inflamassoma por cálcio. Ligantes de NLRP3 mobilizam íons  $Ca^+$  do retículo endoplasmático, um importante reservatório deste íon, durante a ativação do inflamassoma. A inibição farmacológica de cálcio e o uso de quelantes são capazes de bloquear a secreção de IL-1 $\beta$  (Franchi *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2009). Porém, a participação do cálcio ao estímulo do NLRP3 se mantém controverso, pois segundo estudo feito por Katsnelson, *et al.* mostrou que a ativação do inflamassoma é independente da sinalização por cálcio quando há ação do potássio, ou seja, apenas o efluxo de potássio é necessário para a ativação do inflamassoma, sem a participação do cálcio (Katsnelson *et al.*, 2015).

ROS mitocondrial também exercem um papel central na ativação do inflamassoma NLRP3, durante um estímulo que desestabilize a mitocôndria. Porém, alguns estudos mostram que a falta de NADPH, necessária para atividade mitocondrial, não bloqueia a ativação do inflamassoma (Van Bruggen *et al.*, 2010). Dados demonstram que o mal funcionamento da mitocôndria tem relação com ativação de NLRP3 foram baseados em estudos com inibidores químicos que causam perturbações na organela, porém, esses inibidores podem produzir resultados artificiais responsáveis pela ativação do inflamassoma (He *et al.*, 2016). Por outro lado, sabe-se que a mitocôndria está envolvida com o inflamassoma por meio da cardiolipina, um fosfolípido da membrana mitocondrial que, em condições normais, está voltada para o interior da membrana, mas que pode externalizar e ativar o complexo (He *et al.*, 2016; Swanson *et al.*, 2019).

A ruptura dos lisossomos é ativadora do inflamassoma devido à catepsina, protease de cisteína da família das papaínas, que, uma vez no citosol, é capaz de induzir a oligomerização de NLRP3. O fato é confirmado por estudos que mostram que a inibição de catepsina impede a ativação de NLRP3 (He *et al.*, 2016; Swanson *et al.*, 2019). Alguns estudos indicam que dano nos lisossomos promovem o efluxo de  $K^+$  e desse efluxo gera a ativação do inflamassoma, porém, ainda são necessários

mais estudos para esclarecimento desse mecanismo (He *et al.*, 2016; Swanson *et al.*, 2019).

## 2.7 Papel do Inflamassoma NLRP3 na indução da TEM

Os inflamassomas são complexos intracelulares formados por receptores da família Nod, como discutido anteriormente, majoritariamente pertencente a células do sistema imune inato como macrófagos e células dendríticas. Porém, estudos mostram a ativação do complexo em células do epitélio de certos tecidos, como rins e baço (Lech *et al.*, 2010). Mas, ainda há poucos dados na literatura sobre a ativação do inflamassoma em células renais, apesar da expressão de IL-1 $\beta$  e IL-18 ter sido demonstrada em células epiteliais tubulares (Homsí *et al.*, 2006).

A relação entre o inflamassoma e o aparecimento de fibrose não está clara. Um dos caminhos para a elucidação da questão é estabelecer uma relação entre o complexo e a TEM. O papel do inflamassoma NLRP3 foi questionado por Wang *et al.* após demonstrarem que a TEM acontece de forma independente à formação do complexo, sendo somente necessária apenas a presença de NLRP3 (Wang *et al.*, 2013). Quando ASC e caspase-1 são inibidas há TEM, porém, a inibição de NLRP3 impede a ocorrência de TEM (Wang *et al.*, 2013).

A relação entre TGF- $\beta$  e inflamassoma também não é bem esclarecida (Wang *et al.*, 2013). A compreensão de que o inflamassoma tem a função de ativar IL-1 $\beta$  e que essa citocina está relacionada com o aumento da expressão de TGF- $\beta$  induz que a formação do complexo promove a TEM via TGF- $\beta$  devido ao papel da IL-1 $\beta$ . Zhang e colaboradores demonstraram uma relação entre o inflamassoma e a TEM em um modelo *in vitro* induzido pela angiotensina II que ativa o inflamassoma via ROS; a via pela qual ocorre a TEM é a ativação do complexo que forma a IL-1 $\beta$  e então, essa citocina fosforila Smad2/3 que se liga à Smad4 e internaliza ao núcleo para transcrever genes relacionados a TEM, porém, a participação do TGF- $\beta$  não foi analisada (Zhang *et al.*, 2016). Em 2009, Doerner e Zuraw publicaram dados que mostram a relação de IL-1 $\beta$  em aumentar os níveis de expressão de TGF- $\beta$  e como consequência levar a TEM em modelo *in vitro* de células do epitélio brônquico (Doerner e Zuraw, 2009). Romero *et al.* sugere que há uma interação física entre o inflamassoma NLRP3 com os fatores de transcrição Smad2/3 no núcleo para regular a expressão de genes responsáveis pela TEM colaborando com os resultados obtidos por Zhang em relação

a participação do inflamassoma e a dependência de Smad para levar a TEM. (Romero *et al.*, 2017).

Em fibrose renal, pulmonar e hepática a participação do inflamassoma NLRP3 em induzir TEM pode estar relacionado com a ação do TGF- $\beta$  (Wang *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2017). Tian e colaboradores demonstraram em um modelo de fibrose pulmonar induzido por Bleomicina que a ativação do inflamassoma leva a TEM via TGF- $\beta$ , pois quando há o silenciamento do NLRP3 os níveis de TGF- $\beta$  se reduzem e não ocorre TEM (Tian *et al.*, 2017). A relação entre inflamassoma e a TEM é controversa, especialmente na relação entre a independência ou não da formação do complexo para ocasionar a transição, bem como a relação entre o inflamassoma e o TGF- $\beta$  não ter um consenso e a interação entre ambos não ser bem compreendida. Assim, a hipótese de que o TGF- $\beta$  pode ativar o inflamassoma será o objeto de estudo do presente projeto, visto que os dados sobre o inflamassoma e a IL-1 $\beta$  aumentarem os níveis de TGF- $\beta$  já terem sido explorados e motivo de debate na literatura. Com isso, esperamos demonstrar pela primeira vez que o TGF- $\beta$  tem potencial de disparar a ativação do inflamassoma e uma esquematização de como essa relação existe está na figura 1.

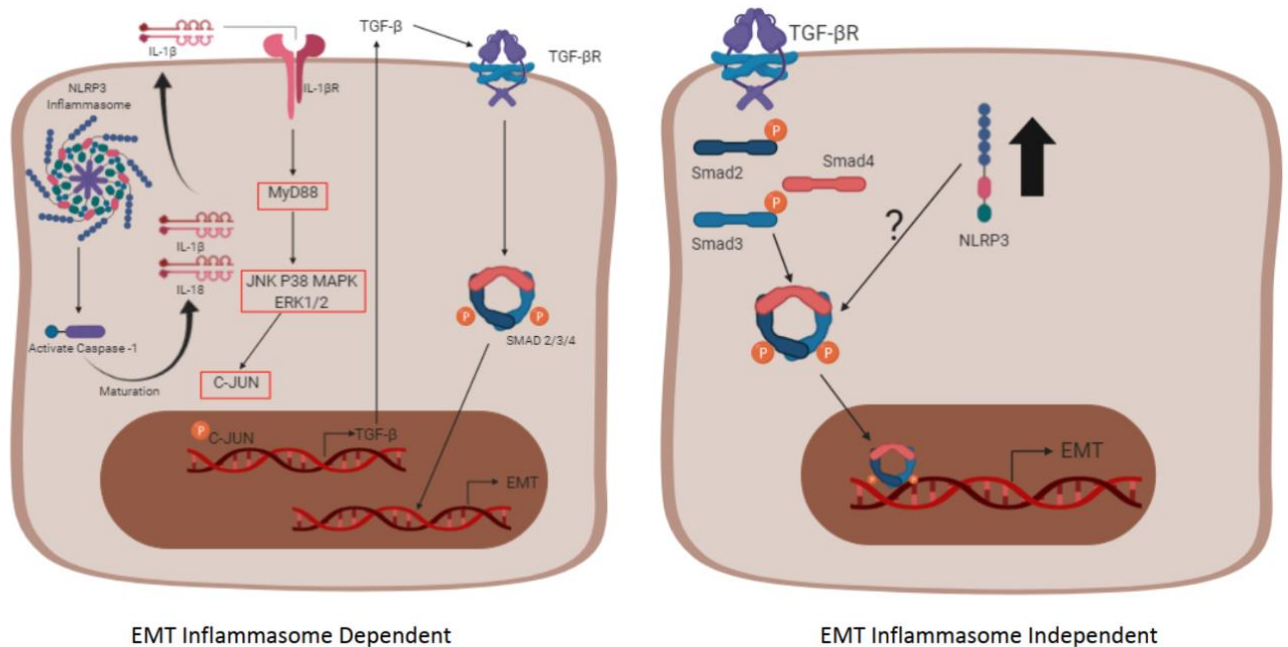


Figura 1 - Relação Inflamassoma e TGF durante a TEM. À esquerda apresenta-se a via de ativação da TEM dependente da oligomerização do inflamassoma, no qual, via a citocina IL-1 $\beta$ , aumenta os níveis de TGF- $\beta$  e fatores de transcrição SMAD3/4 que auxiliam a transcrição de genes característicos da TEM. À direita, encontra-se a via independente ao Inflamssoma, no qual a sinalização celular iniciada por TGF- $\beta$ , aparentemente, aumenta os níveis de expressão do NLRP3, porém, sua relação com a via de sinalização do TGF- $\beta$  não é totalmente esclarecida.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

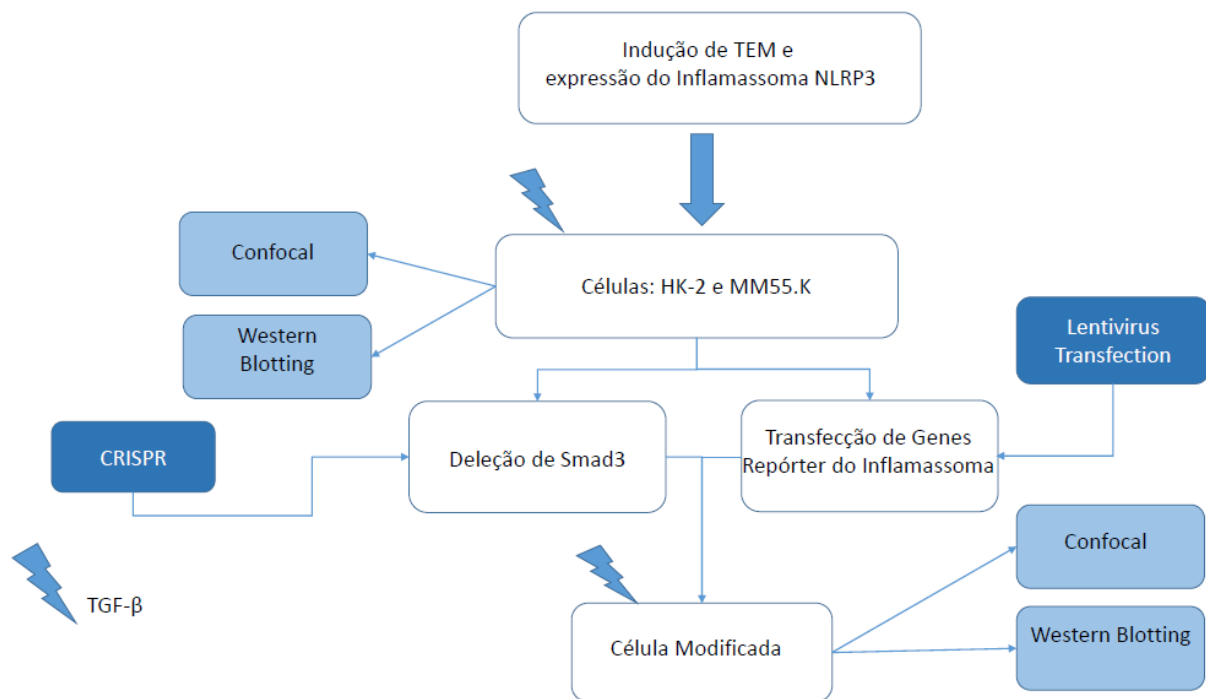


Figura 2 - Fluxograma da Metodologia. A metodologia é baseada na cultura de células das linhagens HK-2 (células imortalizadas do túbulo renal humano) e MM55-K (células tubulares murinas). Em ambos os modelos haverá edição genica para interrupção do gene da Smad3 via CRISPR e transfecção dos genes repórteres do inflamassoma (NLRP3-GFP<sup>+</sup> e ASC-Cerulean<sup>+</sup>) via transfecção viral por Lentivírus. Ambas as células modificadas serão tratadas com TGF- $\beta$  afim de induzir a TEM. Após a indução será avaliado a expressão dos genes do inflamassoma via microscopia confocal e a confirmação da TEM por western blotting. O controle são as células não modificadas.

#### 3.1 Células

Em 1994 Ryan et al imortalizou as células humanas HK-2, célula epitelial do túbulo proximal renal, utilizando o vírus papiloma. A vantagem deste tipo celular é a manutenção do fenótipo do túbulo proximal com isso a função dos transportadores de

membrana e enzimas são mantidas no modelo (Vrbová M et al. 2016, Arbillaga et al. 2007, Racusen et al. 1997, Ryan et al. 1994, Trifillis et al. 1985). No ramo da farmacologia a HK-2 é modelo para estudos de nefrotoxicidade (Vrbová M et al. 2016). As condições para manter a célula em cultura são: estufa com 37°C de temperatura, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. O meio para manter a nutrição das células contem RPMI e 10% de SBS (Soro Bovino fetal). Além de RPMI, o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) também poderá ser utilizado, suplementado com SBS. As células são mantidas em garrafas próprias para cultura celular com volume total de 20mL, porém, as HK-2 crescerão com 10 mL de meio até atingir a confluência máxima dentro da garrafa. Neste estudo a HK-2 tem um papel fundamental visto que é origem do túbulo proximal renal, local onde pode ocorrer fibrose em nefropatias que comprometem a função renal. O outro modelo celular utilizado é a MM55.K, células tubulares murinas que são mantidas na estufa nas mesmas condições que a HK-2. Para o protocolo de transfecção, que é o empacotamento do vírus, foram utilizadas HEK-293, células embrionárias renais humanas, mantidas nas mesmas condições na estufa como as demais já mencionadas.

### **3.2 Knockout Smad3**

O método para deleção, o dos genes de Smad3 foi realizado via CRIPSR/Cas9. Uma técnica de edição gênica que permite o recorte de sequencias genicas de interesse para silenciar a expressão do gene. Para isso, foi montado um plasmídeo no qual existe a sequência codificadora para Cas9 e um sitio no qual é inserido as sequências de reconhecimento do gene alvo, neste caso, construímos primers através do software. Os primers construídos a partir de oligonucleotídeos que existem na forma "forward" e "reverse" para que seja realizado o reconhecimento nas sequencias 3' ----- 5' e 5'----- 3' do DNA da célula HK-2. O plasmídeo, em volume de 5 µL, é previamente cortado utilizando a enzima Bsal (1µL) em meio com tampão específico (2 µL) para que então esses primers de reconhecimento da sequência Smad3 sejam adicionados. O anelamento dos oligonucleotídeos segue o protocolo no qual são utilizados 5 µL do "forward" e do "reverse"; e então incubados a 95°C por 10 min e por fim 1 hora no gelo. Os primers, após a reação de anelamento, é adicionado no plasmídeo cortado por Bsal. Para confirmar que a sequencia foi inserida no vetor utilizamos uma PCR de colônia e o sequenciamento do vetor.

### 3.3 Genes do Inflamassoma e do Lentivirus

No presente trabalho os genes de interesse são aqueles que codificam as proteínas formadoras do inflamassoma, NLRP3 e ASC, assim como os genes que promovem o empacotamento do vírus, sendo eles VSG e PMV. Os plasmídeos foram obtidos por doação do pesquisador Eicke Latz, do laboratório de imunidade inata da University of Bonn e da Universidade de São Paulo, em papel filtro com desenho circular no centro onde se encontravam os plasmídeos. O círculo foi recortado utilizando uma tesoura e inserido em tubo de 1 mL junto com 40 µL de solução tampão e centrifugados por 30 segundos para recuperar o plasmídeo que se encontrava no papel filtro. O próximo passo era inserir o plasmídeo recuperado em *E.coli*. Para isso, adicionou-se 3 µL do plasmídeo em tubos de 1 mL contendo *E.coli* em solução localizada dentro de caixa com gelo. Para o plasmídeo ser transformado foi necessário promover um choque térmico nas bactérias que continham o plasmídeo. O choque térmico foi realizado a 42°C por 42 segundos. Após esse choque o conteúdo do tubo é transferido para um novo tubo contendo meio SOC e passam por uma centrifugação em 37°C por 45 minutos a 1200 rpm. O último passo foi transferir o conteúdo do tubo com meio SOC para uma placa de petri contendo ampicilina, pois é o antibiótico no qual os plasmídeos contêm o gene de resistência.

### 3.4 Miniprep

Para as etapas seguintes do projeto foi necessário recuperar esses plasmídeos transformados em *E.coli*. Para isso foi realizado o protocolo da miniprep para a formação de um concentrado de DNA plasmidial. Antes de iniciar o protocolo propriamente dito prepara-se inóculos para utilizar na miniprep. Estes consistem em retirar uma colônia da placa de petri e colocá-las em vidraria própria para inóculo com 5mL de meio LB (Luria-Bertani), 2,5 µL de ampicilina. O vidro com o inóculo permanece em um *shaker* a 37°C “overnight” (16h a 20h após preparo do inóculo).

O protocolo da miniprep se inicia retirando 1,5mL do inóculo e adicionando-o em tubo de volume igual a 1,5 mL. Então, centrifuga-se o tubo e descarta-se o sobrenadante, mantendo o pellet no tubo. Após o descarte, adiciona-se 200 µL da primeira solução do protocolo P1 para ressuspender o pellet, logo em seguida adiciona a solução P2 e homogeniza-se o tubo. Então a última solução P3 é

adicionada. A próxima etapa é centrifugar o tubo em rotação máxima (15000 rpm) por 12 minutos. Em um novo tubo de 1,5 mL prepara-se 600 µL de clorofórmio 70% para que se adicione 600 µL do sobrenadante formado na última centrifugação. Assim, ocorre uma nova centrifugação nas mesmas condições de rotação máxima por 12 minutos. O próximo passo é adicionar 1 mL de etanol em um novo tubo de 1,5 mL que irá receber 400 µL do sobrenadante da centrifugação anterior. O novo tubo é então incubado a -20°C por no mínimo 15 minutos. Por fim, uma nova centrifugação ocorre em rotação máxima por 20 minutos, elimina-se o sobrenadante e espera a secagem do etanol e então ressuspende o pellet com 30 µL de água MiliQ. O resultado final pode ser mantido congelado em -20°C.

### 3.5 Transfecção

Os DNAs de interesse serão transduzidas para o interior das células HK-2. A transdução foi feita utilizando lentivírus, no qual o DNA de interesse é empacotado no envelope viral em células HEK-293 esquematizado na figura x. Após o empacotamento, os vírus são recolhidos do sobrenadante das placas de HEK 293 e adicionados as placas da célula de interesse, neste caso HK-2, com filtro específico para que não haja a passagem de células HEK-293. Após a transdução, as células foram sorteadas para recuperar apenas aquelas que passaram por uma transdução bem-sucedida. O empacotamento foi realizado com os DNA's do NLRP3-GFP<sup>+</sup>, ASC-Cerulean<sup>+</sup> e um duplo positivo NLRP3-GFP<sup>+</sup> + ASC-Cerulean<sup>+</sup>. O sorteamento foi realizado no FACS/Melody<sup>®</sup> localizado no CTAF no setor de ciências biológicas da UFPR.

### 3.6 Indução de EMT via TGF-β

Das células em cultura a indução de TEM via TGF-β é realizada em todas as garrafas. Na célula duplo positiva (NLRP3-GFP e ASC-cerulean) esperava-se observar a formação do complexo do inflamassoma pela ligação entre NLRP3 e ASC além de observar os marcadores da TEM sendo eles *downregulation* de E-caderina e *upregulation* de α-SMA e/ou FSP-1 e/ou MMP-9. O tratamento por TGF-β realizou-se em placa de 6 poços com confluência celular entre 70% - 80% e uma concentração de TGF-β de 10ng/ml durante 48h para induzir a TEM.

### 3.7 Microscopia Confocal

As células foram transfectadas com genes que codificam as proteínas do inflamassoma com marcação fluorescente, sendo NLRP3 GFP<sup>+</sup> e ASC Cerulean<sup>+</sup>. Após a indução da TEM via TGF- $\beta$  espera-se observar a colocalização das proteínas do inflamassoma no microscópio confocal.

### **3.8 Western Blotting**

Para observar a ocorrência da TEM realizou-se um western blotting utilizando os anticorpos anti marcadores de TEM como anti- $\alpha$ SMA e anti-Ecaderina. As células HK-2 foram lisadas com tampão RIPA e então o conteúdo porteico é transferido para um gel de eletroforeses de poliacrilamida e então via eletroforese é passada para uma membrana específica de western blotting, podendo ser PVDF. A ação seguinte é a incubação com os anticorpos primários (anti- $\alpha$ SMA e anti-Ecaderina) por um período *overnight* a 4°C. Por fim, há a incubação com os anticorpos secundários a temperatura ambiente por 2h e então a membrana é revelada.

## **4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS**

### **4.1 Indução da TEM em MM55.K e HK-2**

A TEM nas células MM55.K foi induzida com TGF- $\beta$  na concentração de 10ng/ml por 48horas. Para confirmar a TEM foi realizado uma microscopia óptica, pois essas células tem característica tubular e se aderem à placa, após TEM, perdem ambas características (Fig. 3A e Fig. 3B). Outro método para confirmar a TEM é o Western Blotting com o objetivo observar a redução da expressão de E-caderina e o aumento de  $\alpha$ -SMA (Fig. 3C). Porém, não observamos a presença de E-caderina no controle e na célula tratada, quanto a  $\alpha$ -SMA observamos em ambas os grupos, porém, sem diferenças nos níveis de expressão. De acordo com a literatura, deveria ser observado uma redução de E-caderina na célula tratada em comparação ao controle e  $\alpha$ -SMA o contrário, redução no controle e aumento no tratado. A indução não foi realizada nas células HK-2.

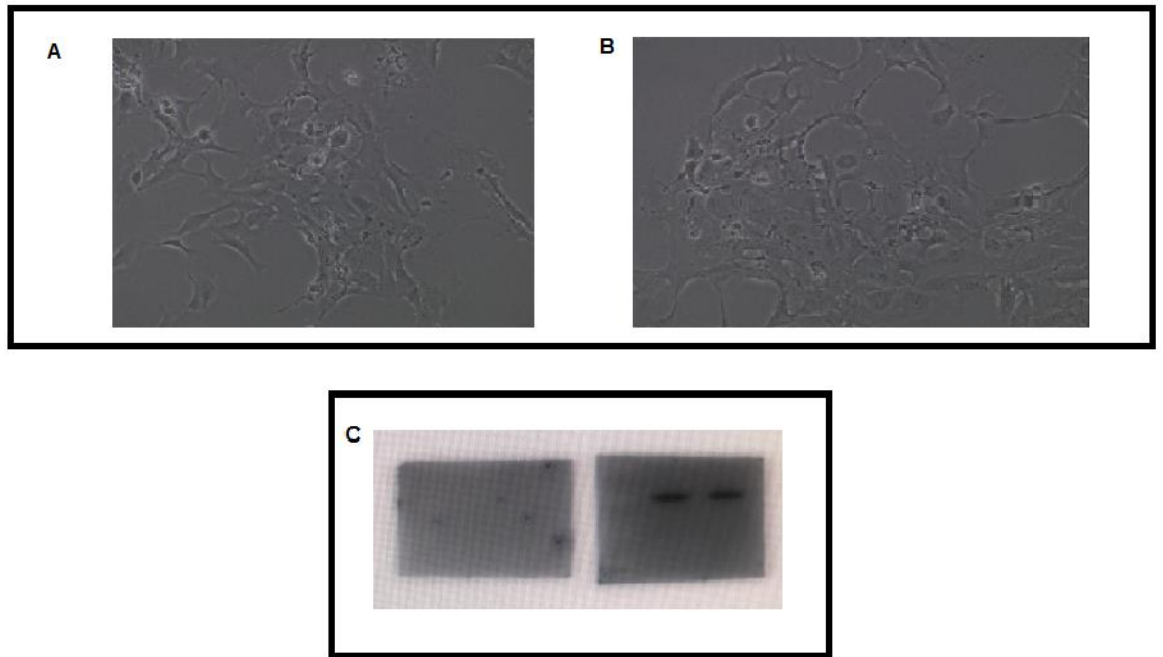


Figura 3 - A. Célula MM55.K controle. B. Célula MM55.K com TEM induzida por TGF pós 48h. C. Western Blotting para marcadores de TEM (À esquerda E-Caderina, à direita  $\alpha$ -SMA).

#### 4.2 Transdução dos genes repórter do Inflamassoma.

A partir da transdução dos genes do inflamassoma as células HK-2 foram sorteadas para que a indução da TEM seja realizada apenas nas células que receberam os genes do inflamassoma. O sorteio foi realizado no FACS/Melody<sup>®</sup> para recuperar aquelas que estão expressando os genes marcados com fluorescência (GFP e Cerulean). A transdução foi realizada com sucesso pois foi observado população de células HK-2 GFP<sup>+</sup> (Figura 4). Porém não foi possível recuperar as células após o sorteio, pois de acordo com engenheiros responsáveis pelo equipamento, houve um erro na instalação no qual havia uma pressão interna alta e devido a isso, as células estava morrendo.

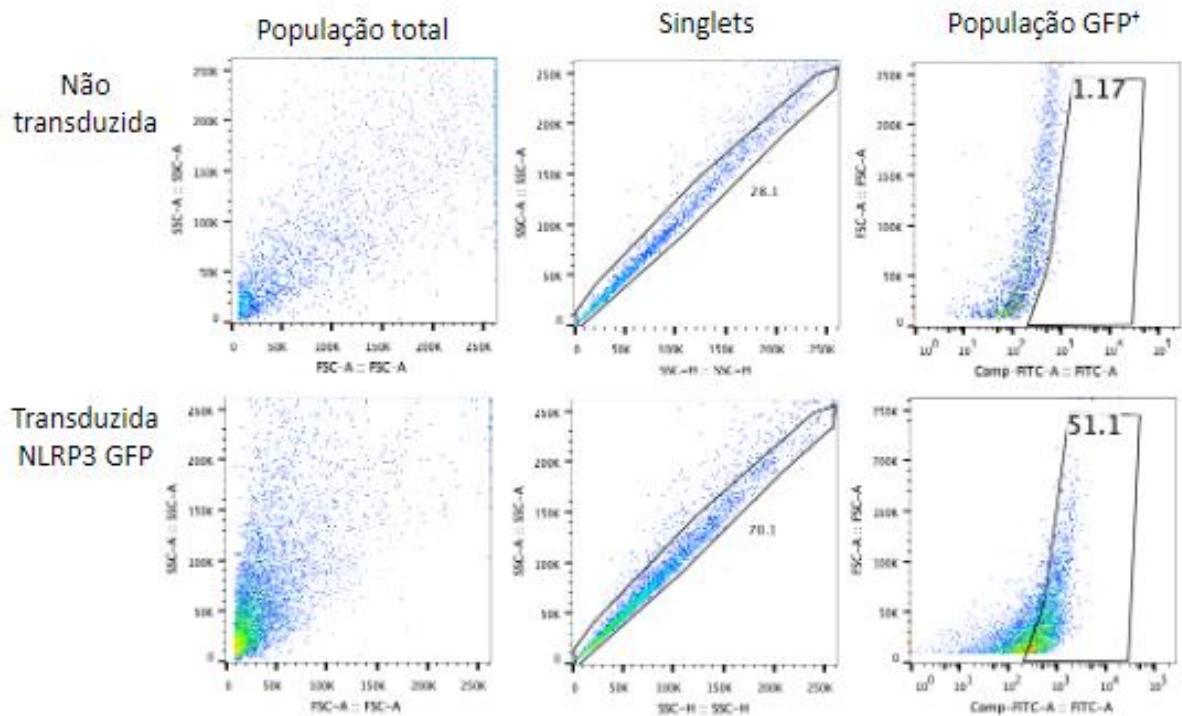


Figura 4 - Sorteio da população de células NLRP3 GFP<sup>+</sup>. O sorteio é realizado no equipamento FACS/Melody<sup>®</sup> no qual detecta-se as células expressando genes repórteres e as separa das quais não há essa expressão.

### 4.3 Deleção do gene SMAD3

Para deletar o gene da SMAD3 foi realizado a partir da técnica do CRISPR/Cas9. O vetor px-601 contendo a Cas9 foi aberto com a enzima de restrição BsaI para adicionar a sequência guia de deleção da SMAD3 (*Forward*: 5'CACCGAATCCGATGTCCCCAGCAC3' e *Reverse*: 5'AAACGTGGGGACATCGGATTC3'). Após a abertura do plasmídeo a sequência é inserida no vetor e transformada em E.coli. Para confirmar que a sequência foi inserida no vetor foram realizadas uma PCR de colônia (Figura 5) e o sequenciamento (Figura 6). A deleção propriamente dita não ocorreu.

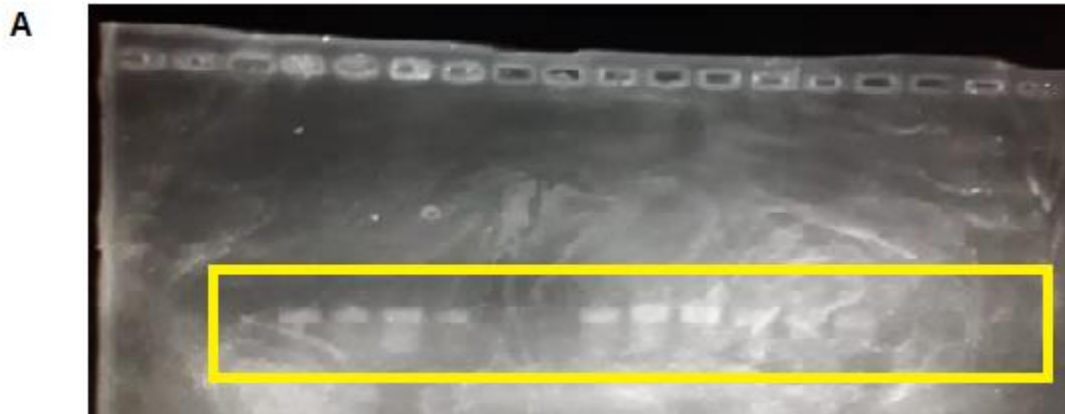


Figura 5 - PCR de colônia das E.coli que receberam o plasmídeo Px-601 com a sequência guia da Smad3. Após a montagem do sistema CRISPR ocorre a expansão desse DNA em células de E.coli, para obter uma quantidade maior de DNA. Para confirmar que a sequência guia está inserida no vetor, realizou-se uma PCR de colônia utilizando o primer reverse da sequência de Smad3 e um primer forward do plasmídeo Px-601. Os produtos de PCR mostrados no quadro amarelo sugerem que a inserção da sequência no vetor e sua expressão foram bem sucedidas.

A

```

TTTTGTACCGTGTGAGTATGTGCAGGTGTTCTAGGTACCTCAAGAAGGATTTTAAATCGGAGCAGAAATTAGGCTAACCGG
GGGCCTTATTAGGAAGAGATCAACTCTATAATACTATTGTAAACAGCACACGCAATTTCTTAATAATTTTCTTCCCTAGTAATA
CCAGTAATAATCGGAGGATTTGGAAATTTGATGGTACCACTAATACTAGGAGCCCCAGACATAGCCCTTCCCACGCCCTTAA
CAACATAAGATTCTGACTACTTCCACCCCTCCTTAATCTTACTTCTATCAAGAGCCCGCTAGAAAAAGGCGTAGGTACAG
GATGAACGTGTCTACCCCTCTTTCAAGAAATATTGCCCATGCAGGACCATCAGTAGATTTAGCAATCTTTCTCTTCAT
TTAGCTGGGGTATCATCAATCATGGGAGCCCTAAATTTTATCAACAGTCATTAATATACGATCAAAAGGACTACGCTCT
AGAACGAGTTCACACTATTTGTTGATCAGTAGTAATTACAGCAATTTCTTCTTCTAAGACTGCCCGTACTTGCAGGAG
CTATTACTATACTATTAAACAGATCGAAATTTAAACACTGCATTTTTCGACCCCTGOTGGAGGAGGAGATCCTATTTTATAT
CAACACTTATTTCTGATTTTTTGGTCACTTGGAAATTTTAA

```

B

select all 100 sequences selected

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Hediste atoka mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, haplotype_A19	628	628	95%	7e-176	84.10%	<a href="#">AB603860.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Hediste atoka mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, haplotype_A20	623	623	95%	3e-174	83.97%	<a href="#">AB603861.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Hediste atoka mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, haplotype_A21	623	623	95%	3e-174	83.94%	<a href="#">AB603862.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Hediste atoka mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, haplotype_A29	590	590	95%	3e-164	83.03%	<a href="#">AB603870.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Hediste atoka mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, haplotype_A28	584	584	95%	2e-162	82.87%	<a href="#">AB603869.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	Hediste atoka mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, haplotype_A07	577	577	95%	3e-160	82.77%	<a href="#">AB603868.1</a>

Figura 6 – A. Resultado do sequenciamento para confirmação do vetor CRISPR com a sequência guia de SMAD3. B. Consulta do software Blast do resultado do sequenciamento.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o objetivo de verificar se a indução de TEM via TGF- $\beta$  ativa o inflamassoma ou não células modificadas (HK-2 e MM55.K) seriam transfectadas com genes repórter do inflamassoma via Lentivirus. A HK-2 foram transfectadas com sucesso, porém, o sorteamento no FACS/Melody<sup>®</sup> não foi sucedido devido à problemas de instalação do equipamento, no qual gerou uma pressão excessiva no

seu interior matando as células. Isso impediu o prosseguimento da metodologia, que no caso, seria a indução de TEM via TGF- $\beta$  nas células transduzidas com os genes do inflamassoma. Para as MM55.K a indução foi realizada, mas no western blotting não demonstrou a presença de E-Caderina e não houve diferença na expressão de  $\alpha$ -SMA, sendo necessário a repetição do método. Para HK-2 não houve indução de TEM por não obter sucesso no crescimento das células nas placas por falta de fatores de crescimento necessários.

Para deletar o gene da SMAD3 utilizamos a técnica de CRISPR/Cas9. Para realizar a técnica foi necessário inserir a sequência guia ao vetor Px-601 que contém a sequência Cas9. Após a abertura do vetor com BsaI e inserção da sequência guia a PCR de Colônia nas células transformadas com o vetor demonstrou produtos de PCR a partir de um primer do próprio vetor e primer *Reverse* da sequência SMAD3, com isso, sugere-se que a sequência está inserida no vetor, porém, para ter a absoluta certeza o sequenciamento foi realizado. A sequência resultante não era a esperada, sendo requisitada a repetição do sequenciamento após correção do problema no sequenciador.

Devido aos problemas enfrentados durante a execução da metodologia proposta, não foi possível observar a formação do complexo do inflamassoma NLRP3 após a indução de TEM via TGF- $\beta$  na presença ou ausência de SMAD3. Os principais problemas encontrados durante a execução foram os erros no momento do sorteamento das células transduzidas, o problema no sequenciador para confirmar a inserção da sequência guia no vetor Px-601 e o não crescimento das células de interesse em cultura em uma confluência desejável por falta do fator de crescimento necessário. Devido ao tempo reduzido os experimentos que obtiveram falhas não foram repetidos o que garantiu o insucesso dos resultados.

Durante a execução do presente trabalho a revisão bibliográfica gerou um artigo de revisão em língua inglesa com o título *The role of NLRP3 Inflammasome Activation in the Epithelial to Mesenchymal Transition Process during the Fibrosis* escrito por mim e pela mestrande Amani Alyasser revisado pelo professor Dr. Tarcio Teodoro Braga e está em fase final de correção da metodologia para envio para publicação.

## **5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para o futuro, recomenda-se a repetição dos procedimentos nos quais ocorreram falhas como o problema do equipamento de sorteio, o western blotting não conclusivo; e o aprofundamento do projeto com perguntas surgidas no decorrer de sua execução como “A SMAD3 e o NLRP3 possuem interação física?”, “O SMAD3 tem o potencial de funcionar como um fator de transcrição do gene que codifica o NLRP3 e suas citocinas relacionadas?”.

## REFERÊNCIAS

CAREW, R. M.; WANG, B.; KANTHARIDIS, P. The role of EMT in renal fibrosis. **Cell Tissue Res**, v. 347, n. 1, p. 103-16, Jan 2012. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21845400> >.

CHU, J. et al. Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1beta from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. **J Leukoc Biol**, v. 86, n. 5, p. 1227-38, Nov 2009. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19675207> >.

DATTO, M. B. et al. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 4, p. 2495-504, Apr 1999. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082515> >.

DE ZOETE, M. R. et al. Inflammasomes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 12, p. a016287, Oct 2014. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25324215> >.

DOERNER, A. M.; ZURAW, B. L. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. **Respir Res**, v. 10, p. 100, Oct 2009. ISSN 1465-993X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857272> >.

FENYO, I. M.; GAFENCU, A. V. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. **Immunobiology**, v. 218, n. 11, p. 1376-84, Nov 2013. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886694> >.

FITCHETT, J. E.; HAY, E. D. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. **Dev Biol**, v. 131, n. 2, p. 455-74, Feb 1989. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2463946> >.

FRANCHI, L. et al. Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K<sup>+</sup> for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. **J Biol Chem**, v. 282, n. 26, p. 18810-8, Jun 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17491021> >.

FUJITA, M. et al. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha diminishes pulmonary fibrosis induced by bleomycin or transforming growth factor-beta. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 29, n. 6, p. 669-76, Dec 2003. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12816730> >.

FURUKAWA, F. et al. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. **Hepatology**, v. 38, n. 4, p. 879-89, Oct 2003. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512875> >.

HAHN, S. A. et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. **Science**, v. 271, n. 5247, p. 350-3, Jan 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8553070> >.

HATA, A. et al. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. **Nature**, v. 388, n. 6637, p. 82-7, Jul 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9214507> >.

HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. **Trends Biochem Sci**, v. 41, n. 12, p. 1012-1021, 12 2016. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27669650> >.

HEYER, J. et al. Postgastrulation Smad2-deficient embryos show defects in embryo turning and anterior morphogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 22, p. 12595-600, Oct 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10535967> >.

HOMSI, E.; JANINO, P.; DE FARIA, J. B. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. **Kidney Int**, v. 69, n. 8, p. 1385-92, Apr 2006. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557226> >.

HUANG, X. R. et al. Mice overexpressing latent TGF-beta1 are protected against renal fibrosis in obstructive kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 295, n. 1, p. F118-27, Jul 2008. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448597> >.

IWANO, M. et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. **J Clin Invest**, v. 110, n. 3, p. 341-50, Aug 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163453> >.

JHA, S.; TING, J. P. Inflammasome-associated nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat proteins and inflammatory diseases. **J Immunol**, v. 183, n. 12, p. 7623-9, Dec 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007570> >.

KATSNELSON, M. A. et al. K<sup>+</sup> efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca<sup>2+</sup> signaling. **J Immunol**, v. 194, n. 8, p. 3937-52, Apr 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25762778> >.

KIM, Y. K.; SHIN, J. S.; NAHM, M. H. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. **Yonsei Med J**, v. 57, n. 1, p. 5-14, Jan 2016. ISSN 1976-2437. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26632377> >.

LECH, M. et al. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. **Int Immunol**, v. 22, n. 9, p. 717-28, Sep 2010. ISSN 1460-2377. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20584763> >.

LEE, K. Y. et al. NF-kappaB and activator protein 1 response elements and the role of histone modifications in IL-1beta-induced TGF-beta1 gene transcription. **J Immunol**, v. 176, n. 1, p. 603-15, Jan 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365456> >.

LIM, A. K. et al. Role of MKK3-p38 MAPK signalling in the development of type 2 diabetes and renal injury in obese db/db mice. **Diabetologia**, v. 52, n. 2, p. 347-58, Feb 2009. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066844> >.

LOEFFLER, I.; WOLF, G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Diabetic Nephropathy: Fact or Fiction? **Cells**, v. 4, n. 4, p. 631-52, Oct 2015. ISSN 2073-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473930> >.

LORENZ, G.; DARISIPUDI, M. N.; ANDERS, H. J. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 29, n. 1, p. 41-8, Jan 2014. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24026244> >.

LUO, D. D. et al. Interleukin-1 beta regulates proximal tubular cell transforming growth factor beta-1 signalling. **Nephrol Dial Transplant**, v. 24, n. 9, p. 2655-65, Sep 2009. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19420104> >.

MAAROUF, O. H. et al. Paracrine Wnt1 Drives Interstitial Fibrosis without Inflammation by Tubulointerstitial Cross-Talk. **J Am Soc Nephrol**, v. 27, n. 3, p. 781-90, Mar 2016. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26204899> >.

MARIASEGARAM, M. et al. Lefty antagonises TGF-beta1 induced epithelial-mesenchymal transition in tubular epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 4, p. 855-9, Mar 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171171> >.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 13, 2014. ISSN 2051-7599. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24669294> >.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, Aug 2002. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191486> >.

MEDEIROS, A. I. et al. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infect Immun**, v. 72, n. 3, p. 1637-44, Mar 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977971> >.

MUÑOZ-PLANILLO, R. et al. K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1142-53, Jun 2013. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23809161> >.

NEELISETTY, S. et al. Renal fibrosis is not reduced by blocking transforming growth factor- $\beta$  signaling in matrix-producing interstitial cells. **Kidney Int**, v. 88, n. 3, p. 503-14, Sep 2015. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25760325> >.

NEGRONI, A. et al. NOD2 and inflammation: current insights. **J Inflamm Res**, v. 11, p. 49-60, 2018. ISSN 1178-7031. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29483781> >.

NOMURA, M.; LI, E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. **Nature**, v. 393, n. 6687, p. 786-90, Jun 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9655392> >.

PELLEGRINI, C. et al. Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation. **Front Immunol**, v. 8, p. 36, 2017. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179906> >.

PERREGAUX, D.; GABEL, C. A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. **J Biol Chem**, v. 269, n. 21, p. 15195-203, May 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8195155> >.

PROELL, M. et al. The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. **PLoS One**, v. 3, n. 4, p. e2119, Apr 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18446235> >.

PRÓCHNICKI, T.; LATZ, E. Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition and Metabolic Control. **Cell Metab**, v. 26, n. 1, p. 71-93, Jul 2017. ISSN 1932-7420.

PÉTRILLI, V. et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 9, p. 1583-9, Sep 2007. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599094> >.

ROMERO, C. A. et al. Uric acid activates NLRP3 inflammasome in an in-vivo model of epithelial to mesenchymal transition in the kidney. **J Mol Histol**, v. 48, n. 3, p. 209-218, Jun 2017. ISSN 1567-2387. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28374152> >.

SANMAN, L. E. et al. Disruption of glycolytic flux is a signal for inflammasome signaling and pyroptotic cell death. **Elife**, v. 5, p. e13663, Mar 2016. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27011353> >.

SCHATTGEN, S. A.; FITZGERALD, K. A. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. **Immunol Rev**, v. 243, n. 1, p. 109-18, Sep 2011. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884171> >.

SUN, Y. B. et al. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. **Differentiation**, v. 92, n. 3, p. 102-107, Sep 2016. ISSN 1432-0436. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27262400> >.

\_\_\_\_\_. Endothelial dysfunction exacerbates renal interstitial fibrosis through enhancing fibroblast Smad3 linker phosphorylation in the mouse obstructed kidney. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84063, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24391884> >.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nat Rev Immunol**, Apr 2019. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31036962> >.

TIAN, R. et al. NLRP3 participates in the regulation of EMT in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Exp Cell Res**, v. 357, n. 2, p. 328-334, 08 2017. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28591554> >.

VAN BRUGGEN, R. et al. Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. **Blood**, v. 115, n. 26, p. 5398-400, Jul 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20407038> >.

WANG, W. et al. Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF- $\beta$  signaling in kidney epithelium. **J Immunol**, v. 190, n. 3, p. 1239-49, Feb 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264657> >.

WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nat Med**, v. 18, n. 7, p. 1028-40, Jul 2012. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772564> >.

XIE, M. et al. PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Nat Commun**, v. 7, p. 13280, 10 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27779186> >.

YAO, Q. Y. et al. Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor-beta1 signalling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 156, Sep 2012. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22978413> >.

YU, X. et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway. **J Interferon Cytokine Res**, v. 27, n. 2, p. 103-9, Feb 2007. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316137> >.

YUE, T. L. et al. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) induces transforming growth factor-beta, (TGF-beta 1) production by rat aortic smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 204, n. 3, p. 1186-92, Nov 1994. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7980594> >.

ZHANG, L. et al. Smad2 protects against TGF- $\beta$ 1/Smad3-mediated collagen synthesis in human hepatic stellate cells during hepatic fibrosis. **Mol Cell Biochem**, v. 400, n. 1-2, p. 17-28, Feb 2015. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25351340> >.

ZHANG, L. L. et al. Angiotensin(1-7) attenuated Angiotensin II-induced hepatocyte EMT by inhibiting NOX-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated NLRP3 inflammasome/IL-1 $\beta$ /Smad circuit. **Free Radic Biol Med**, v. 97, p. 531-543, 08 2016. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27445100> >.