UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Papel do NLRP3 na disfunção erétil em modelo de hipertensão DOCA/sal e sua possível ativação por ET-1

RAFAEL SOBRANO FAIS

RIBEIRÃO PRETO
2020

RAFAEL SOBRANO FAIS

Papel do NLRP3 na disfunção erétil em modelo de hipertensão DOCA/sal e sua possível ativação por ET-1

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Farmacologia
Orientador: Dr. Fernando Silva Carneiro

Ribeirão Preto
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fais, Rafael Sobrano.

Papel do NLRP3 na disfunção erétil em modelo de hipertensão DOCA/sal e sua possível ativação por ET-1 / Rafael Sobrano Fais; orientador: Fernando Silva Carneiro – Ribeirão Preto, 2020.

101 f.:il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2020.

1.Endotelina-1. 2. Disfunção erétil. 3. NLRP3. 4. Hipertensão arterial I. Fais, Rafael Sobrano. II. Carneiro, Fernando Silva. III. Título.

FAIS, R.S. **Papel do NLRP3 na disfunção erétil em modelo de hipertensão DOCA/sal e sua possível ativação por ET-1**. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências (Farmacologia)

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Dedico:
À minha mãe, Ruth Sueli Sobrano Fais e ao meu pai, Clodail Roberto Fais por toda dedicação e incentivo durante toda minha formação.
À minha esposa, Erica das Neves Palotta Fais, por todo apoio e carinho durante todo esse último ano.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao criador, por tudo de bom que tem me proporcionado durante toda a minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro por toda a dedicação, amizade, compreensão, paciência e por todos os ensinamentos.

Agradeço a Eleni, por ela ter me apresentado o laboratório.

A todos os amigos do laboratório, Camila Pereira, Camila Ziliotto, Carla Pavan, Chicão, Eduardo, Fabíola, Fernanda Ramalho, Fernanda Rodrigues, Karla Bianca, Nathanne, Marcos, Pedro, Rafael Menezes, Rhéure, Thiago Bruder, Thiago Dias, Vânia e a Zidonia. Agradeço por todos os momentos agradáveis, e até pelas chamadas de atenção, durante esses 2 anos que passamos juntos. Desejo fortemente que tenham muita alegria e prosperidade em suas vidas.

À toda a equipe do Prof. Dr. Dario Simões Zamboni, em especial para o Gustavo, o Renam e a Natália por toda ajuda, conselhos que engrandeceram em muito meu trabalho.

Aos professores: Dr. Cláudio Miguel Costa Neto (Dept. de Bioquímica/FMRP/USP), Dr. Dario Simões Zamboni (Dept. Biologia Celular e Molecular/FMRP/USP), Dr. Francisco Silveira Guimarães, Dr. Gustavo Ballejo Oliveira e Dr. Fernando Queiroz Cunha (Dept. Farmacologia/FMRP/USP) por terem cedido equipamentos e reagentes de seus laboratórios para a realização de alguns de nossos experimentos.

À Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack e ao Prof Leonardo Resstel, meus assessores durante o doutorado, e a Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza, pelas críticas e conselhos ao trabalho.

Aos funcionários do departamento: Eliana, Orlando, Ramon, Gislaine e Tadeu, agradeço por toda ajuda, amizade e carinho.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Departamento de Farmacologia, pelo ensino de excelência e por todo suporte oferecido a pesquisa e aos alunos.

Às agências de fomento: CAPES, CNPQ, FAEPA e FAPESP (**processo nº 2016/07641-0**), pois sem a ajuda delas nenhum trabalho seria possível.

Agradeço a toda equipe do professor Ulf Simonsen do laboratório de fisiologia cardiopulmonar na Universidade de Aarhus, onde realizei meu estágio de pesquisa no exterior.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano” (Isaac Newton)

Resumo

FAIS, R.S. Papel do NLRP3 na disfunção erétil em modelo de hipertensão DOCA/ e sua possível ativação por ET-1. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Introdução: A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de alcançar ou manter a ereção do pênis para um desempenho sexual satisfatório. A DE está, frequentemente, associada a fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, e/ou doenças metabólicas como dislipidemia e diabetes. A hipertensão arterial tem se tornado um problema crescente de saúde pública, pois é importante fator de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. Além disso, a DE ocorre com o dobro da frequência em pacientes com hipertensão arterial em relação a pacientes normotensos. Os danos vasculares na hipertensão arterial ocorrem, em parte, devido ao aumento de mediadores inflamatórios. Similarmente, diversos estudos mostram que o aumento da expressão de mediadores inflamatórios está intimamente ligado ao desenvolvimento de DE. A DE é fortemente influenciada pelo aumento da expressão de endotelina-1 (ET-1) em modelo de hipertensão DOCA/sal, devido a seus efeitos contráteis e pró-inflamatórios. O receptor NLRP3 é o membro mais estudado da família do inflamassoma, um complexo multiprotéico do sistema imune inato que desencadeia ativação de caspase-1 e maturação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 beta (IL-1β). O aumento da atividade do receptor NLRP3 promove alterações vasculares, hipertrofia cardíaca e renal, além de aumento na pressão arterial. No entanto, ainda é desconhecido se o NLRP3 contribui para a ação pró-inflamatória da ET-1. **Hipótese**: O NLRP3 medeia efeitos pró-inflamatórios crônicos da ET-1 no CC de animais DOCA/sal, constituindo-se mecanismo importante para a gênese da DE. **Objetivo**: Investigar o papel do NLRP3 na liberação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células do sistema imune, induzido pela ET-1 e na DE associada ao modelo de hipertensão DOCA/sal. **Métodos**: Camundongos C57BL/6 (WT) e deficientes para NLRP3 ($NLRP3^{-/-}$) foram uninefrectomizados e receberam um pellet de silicone contendo desoxicorticosterona acetato (DOCA, 2,4mg/Kg/dia) ou vazio por 21 dias. Estes animais WT foram tratados com bosentan (gavagem 30 mg/Kg/dia) nos últimos 10 dias. Foi verificada a pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda destes camundongos antes e nos dias 3, 7, 10, 14 e 21 após a cirurgia. Os níveis de ET-1 foram avaliados no soro, ao passo que os de IL-1β, TNF-α e IL-6 foram dosados no corpo cavernoso (CC). Avaliamos também a atividade da caspase-1 por meio da sonda fluorescente FLICA. A expressão da caspase-1, pró-caspase-1, IL-1β e pró-IL-1β foi avaliada por Western blotting. A função erétil foi determinada ao estimular eletricamente o nervo cavernoso nas frequências de 0,2 a 20 Hz. A razão entre a média do platô da pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) foi obtida e analisada. A PIC/PAM também foi realizada em resposta a injeção de ET-1 (0,2492 µg/Kg) no CC de camundongos WT com administração prévia de MCC950 (0,42646 µg/Kg) ou veículo no CC. A reatividade do CC foi avaliada pelo relaxamento mediado por estímulo elétrico, para

acetilcolina e nitroprussiato de sódio, ao passo que a contração foi induzida por fenilefrina. Avaliamos, por citometria de fluxo, o infiltrado de células do sistema imune no CC (macrófagos, neutrófilos, linfócitos Th1 e Th17). A expressão de ICAM-1, VCAM-1, de CCL2 alpha-actina do músculo liso e deposição de colágeno foi determinada. Por último, camundongos WT ou deficientes para RAG-1 (RAG-1$^{-/-}$) foram uninefrectomizados e receberam um pellet de silicone contendo DOCA (2,4mg/Kg/dia) ou vazio por 21 dias. Afim de verificar o efeito da depleção de neutrófilos na função erétil, camundongos WT foram tratados com anticorpo para depleção de neutrófilos (BE0075-1, injeção intraperitoneal 200 µg) ou veículo nos dias 12 e 17 após a cirurgia. Foi medida a pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda destes animais antes, e nos dias 3, 7, 10, 14 e 21 após a cirurgia. A PIC/PAM também foi registrada nesse grupo de animais. **Resultados:** Os camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal tiveram aumento dos níveis de TNF-α, atividade da caspase-1, expressão da caspase-1 e IL-1β no CC. O tratamento com bosentan ou a ausência do NLRP3 reverteu ou preveniu estas alterações. Além disso, o tratamento com bosentan, a inibição farmacológica do NLRP3 ou a ausência do NLRP3 restaurou a função erétil (PIC/PAM) e o relaxamento para acetilcolina e para nitroprussitato de sódio no CC de camundongos DOCA/sal. Houve aumento no recrutamento de neutrófilos e linfócitos Th1 para o CC de camundongos DOCA/sal. No entanto, o tratamento com bosentan ou a ausência do NLRP3 preveniu esse aumento. Ainda, o aumento de VCAM-1, ICAM-1 e CCL2 promovido pela hipertensão DOCA/sal foi prevenido pelo tratamento com bosentan ou a deleção gênica do NLRP3. Adicionalmente, observamos que o tratamento com bosentan ou a ausência do NLRP3 previne o aumento na deposição de colágeno ou a de músculo liso no CC dos camundongos DOCA/sal. Por fim, o tratamento com BE0075-1 restaurou completamente o aumento na pressão arterial, na expressão da IL-1β, PIC/PAM, o relaxamento para acetilcolina e para nitroprussiato de sódio em camundongos DOCA/sal. Por outro lado, a deleção gênica do RAG-1 preveniu completamente o aumento na pressão arterial, na expressão da caspase-1, atenuou o prejuízo na função erétil e restaurou o relaxamento para acetilcolina, mas não para nitroprussiato de sódio. **Conclusão:** O NLRP3 constitui-se um mecanismo importante para a gênese da DE, por meio do aumento na liberação de citocinas, recrutamento de neutrófilos e linfócitos Th1**,** promovidos pela ET-1 no CC.
Palavras-chave: Hipertensão DOCA/sal; endotelina-1; disfunção erétil, NLRP3.

Abstract

FAIS, R.S. ENDOTHELIN-1 ROLE IN NLRP3 ACTIVATION IN SMOOTH MUSCLE TISSUE OF CORPORA CAVERNOSA. Dissertation (Master´s degree) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Introduction: Erectile dysfunction (ED) is defined as the inability to achieve or maintain an erection of the penis for satisfactory sexual performance. ED is often associated with risk factors for the development of cardiovascular diseases such as arterial hypertension, and/or metabolic diseases such as dyslipidemia and diabetes. Arterial hypertension has become a growing public health problem, as it is an important risk factor for the onset of cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases. In addition, ED occurs twice as often in patients with arterial hypertension as compared to normotensive patients. Vascular damage in hypertension occurs, in part, due to the increase in inflammatory mediators. Similarly, several studies show that increased expression of inflammatory mediators are closely linked to the development of ED. ED is strongly influenced by increased expression of endothelin-1 (ET-1) in a DOCA/salt model of hypertension, due to its contractile and pro-inflammatory effects. The NLRP3 receptor is the most studied member of the family of the inflammasome, a multiprotein complex of the innate immune system that triggers caspase-1 activation and maturation of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 beta (IL-1β). The increased activity of the NLRP3 receptor promotes vascular alterations, cardiac and renal hypertrophy, in addition to increased blood pressure. However, it is still unknown whether NLRP3 contributes to the pro-inflammatory action of ET-1. **Hypothesis:** NLRP3 mediates chronic proinflammatory effects of ET-1 on CC of DOCA/salt animals, constituting an important mechanism for the genesis of ED. **Objective:** To investigate the role of NLRP3 in ET-1-induced inflammatory process modulation and ED associated with the DOCA/salt hypertension model. **Methods:** C57BL/6 (WT) and NLRP3 deficient ($NLRP3^{-/-}$) mice were uninefrectomized and received a silicone pellet containing deoxycorticosterone acetate (DOCA, 2.4 mg/Kg/day) or empty for 21 days. These WT animals were treated with bosentan (gavage 30 mg/Kg/day) in the last 10 days. The mice systolic blood pressure was checked by tail cuff before and on days 3, 7, 10, 14 and 21 after surgery. The levels of ET-1 were assessed in the serum, whereas IL-1β, TNF-α and IL-6 were measured in the corpora cavernosa (CC). We also evaluated caspase-1 activity using the FLICA fluorescent probe. The expression of caspase-1, pro-caspase-1, IL-1β and pro-IL-1β was evaluated by Western blotting. Erectile function was determined by electrically stimulating the cavernous nerve at frequencies from 0.2 to 20 Hz. The ratio between the mean plateau of intracavernous pressure and mean arterial pressure (ICP/MAP) was obtained and analyzed. ICP/MAP was also performed in response to ET-1 injection (0.2492 µg/Kg) in the CC of WT mice with previous administration of MCC950 (0.42646 µg/Kg) or vehicle in the CC. CC reactivity was assessed by relaxation mediated by electrical stimulus, for acetylcholine and sodium nitroprusside, while contraction was induced by phenylephrine. We evaluated, by flow cytometry, the infiltration of immune system cells in the CC

(macrophages, neutrophils, Th1 and Th17 lymphocytes). The expression of ICAM-1, VCAM-1, of CCL2 smooth muscle alpha-actin and collagen deposition was determined. Finally, WT or RAG-1 deficient mice (RAG-1$^{-/-}$) were uninefrectomized and received a silicone pellet containing DOCA (2.4 mg/kg/day) or empty for 21 days. In order to verify the effect of neutrophil depletion on erectile function, WT mice were treated with antibody for neutrophil depletion (BE0075-1, 200 µg intraperitoneal injection) or vehicle on days 12 and 17 after surgery. Mice systolic blood pressure was measured by tail cuff before, and on days 3, 7, 10, 14 and 21 after surgery. ICP/MAP was also recorded in this group of animals. **Results**: DOCA/salt hypertensive mice had increased levels of TNF-α, of caspase-1 activity, expression of caspase-1 and IL-1β in CC. Bosentan treatment or the absence of NLRP3 reversed or prevented these changes. In addition, bosentan treatment, pharmacological inhibition of NLRP3 or the absence of NLRP3 restored erectile function (ICP/MAP), relaxation for acetylcholine and sodium nitroprussitate in the DOCA / salt mice. There was an increase in the recruitment of neutrophils and Th1 lymphocytes to the DOCA/salt mice CC. However, treatment with bosentan or the absence of NLRP3 prevented this increase. In addition, the increment in VCAM-1, ICAM-1 and CCL2 promoted by DOCA/salt hypertension was prevented by treatment with bosentan or the NLRP3 gene deletion. Additionally, we observed that treatment with bosentan or the absence of NLRP3 prevents the in collagen or smooth muscle deposition increment in the DOCA/salt mice. Finally, treatment with BE0075-1 completely restored the increase in blood pressure, IL-1β expression, ICP/MAP, the relaxation for acetylcholine and for sodium nitroprusside in DOCA/salt mice. On the other hand, the RAG-1 gene deletion completely prevented the increase in blood pressure, caspase-1 expression, attenuated the impairment in erectile function and restored relaxation to acetylcholine, but not to sodium nitroprusside. **Conclusion**: NLRP3 is an important mechanism for the genesis of ED, through increased cytokine release, recruitment of neutrophils and Th1 lymphocytes, promoted by ET-1 in CC.

Keywords: DOCA/salt hypertension; endothelin-1; erectile dysfunction, NLRP3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	**Estrutura anatômica do pênis.** As estruturas principais são representadas pela base, corpo e glande. Figura adaptada	31
2	**Irrigação arterial (A) e retorno venoso (B) do pênis.** Figura adaptada	31
3	**Inervação do pênis.** Figura adaptada	33
4	**Estrutura anatômica do corpo cavernoso.** Anatomia da secção transversal do pênis humano no estado flácido e ereto. O diagrama aproximado mostra como as células endoteliais alinham-se nos espaços cavernosos, que por sua vez são cercados por uma rede de músculo liso. Figura adaptada	34
5	**Estrutura dos 3 isopeptídeos da ET (A) e efeito da ET-1 na pressão arterial (B)**. Figura adaptada	38
6	**Sinalização e formação do complexo inflamassoma.** Primeiro sinal para ativação do inflamassoma NLRP3 ocorre por meio da translocação do NF-κB para o núcleo e transcrição das formas inativas da caspase-1 e IL-1β. A transcrição do NF-κB podo ocorrer por meio da ativação de ET_A, ATI, TLR IL-1R. O segundo sinal, principalmente via aumento na geração de ROS ou ativação do canal purinérgico 7 (P2X7) levam a ativação do NLRP3, recrutamento da proteína acopladora ASC e da pró-caspase-1 e consequente liberação da caspase-1. A caspase-1 promove clivagem da pro-IL-1β e liberação de IL-1β	49

7	**Tempos dos estímulos e administrações durante o experimento para demonstrar a participação aguda do NLRP3 no efeito da ET-1 sobre a PIC/PAM**	55
8	Análise temporal da pressão arterial sistólica, em camundongos WT submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou salina por 10 dias. A seta indica o início do tratamento com bosentan	64
9	Análise dos níveis de ET-1 no soro (**A**) e de IL-1β (**B**), TNF-α (**C**) e IL-6 (**D**) no CC de camundongos WT submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, tratados por 10 dias com bosentan ou salina	66
10	Análise da atividade da caspase-1 medida pela fluorescência para FAM FLICA no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, tratados 10 dias com bosentan ou salina	67
11	Análise densitométrica da expressão de IL-1β (**A**), pró-IL-1β (**B**), caspase-1 (**C**) e pró-caspase-1 (**D**) no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, tratados por 10 dias com bosentan ou salina	69
12	Traçado representativo da pressão arterial (topo) e da pressão intracavernosa (abaixo) de camundongos controle ou DOCA/sal, tratados com veículo ou bosentan. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal	71

13	Traçado representativo da pressão arterial e da pressão intracavernosa de camundongos WT com a administração de veículo **(A)**, ET-1 **(B)** ou MCC950 **(C)**, seguida da administração de veículo ou ET-1 aos 35 minutos do protocolo experimental. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) frente a estímulo por max (16 Hz) ou submax (2 a 8 Hz)	**73**
14	Curvas concentração-efeito para fenilefrina (**A**), relaxamento mediado por estímulo elétrico (**B**), acetilcolina (**C**) e nitroprussiato de sódio (**D**) em tiras de CC de camundongos controle ou DOCA/sal, tratados com veículo ou bosentan	**75**
15	Análise temporal da pressão arterial sistólica, em camundongos WT e deficientes para o receptor NLRP3 ($NLRP3^{-/-}$) submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal	**76**
16	Análise dos níveis de ET-1 no soro (**A**) e de IL-1β (**B**), TNF-α (**C**) e IL-6 (**D**) no CC de camundongos WT e $NLRP3^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal	**77**
17	Análise da atividade da caspase-1 medida pela fluorescência para FAM FLICA em camundongos WT ou $NLRP3^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal	**78**
18	Análise densitométrica da IL-1β (**A**), pró-IL-1β (**B**), caspase-1 (**C**) e pró-caspase-1 (**D**) no CC de camundongos WT e $NLRP3^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal	**80**
19	Traçado representativo da pressão arterial (topo) e da pressão intracavernosa (abaixo) de camundongos WT ou $NLRP3^{-/-}$	**82**

submetidos ao protocolo de hipertensão DOCA/sal. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) em camundongos WT ou NLRP3$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal

20 Curvas concentração-efeito para fenilefrina (**A**), relaxamento mediado por estímulo elétrico (**B**), acetilcolina (**C**) e nitroprussiato de sódio (**D**) em tiras de CC de camundongos WT ou NLRP3$^{-/-}$ submetidos ao protocolo de hipertensão DOCA/sal 84

21 Porcentagem de células Ly6G+ (neutrófilos) (**A**), F4/80+ (macrófagos) (**B**), IFN-γ+ (linfócitos Th1) (**C**) e IL-17+ (linfócitos Th17) (**D**) em tiras do CC de camundongos WT submetidos a hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou veículo e animais NLRP3$^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal 87

22 Análise dos níveis de CCL2 em tiras do CC de camundongos WT submetidos a hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou veículo e animais NLRP3$^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal 87

23 Análise microscópica imuno-histoquímica da expressão de VCAM-1 (**A**) e de ICAM-1 (**B**) em tiras do CC de camundongos WT submetidos a hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou veículo e animais NLRP3$^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal 88

24 Representação microscópica imuno-histoquímica da expressão de α-actina do músculo liso (**A**), e deposição de colágeno (**B**) em tiras do CC de camundongos WT submetidos 90

a hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou veículo e animais NLRP3$^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal

25 Análise temporal da pressão arterial sistólica, em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal e tratados com BE0075-1. As setas indicam a administração do BE0075-1 nos dias 12 e 17 91

26 Análise densitométrica da IL-1β (**A**), pró-IL-1β (**B**), caspase-1 (**C**) e pró-caspase-1 (**D**) no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, tratados nos dias 11 e 16 com BE0075-1 ou salina 92

27 Traçado representativo da pressão arterial e da pressão intracavernosa de camundongos uninefrectomizados ou DOCA/sal tratados com veículo ou BE0075-1. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal 94

28 Curvas concentração-efeito para fenilefrina (**A**), relaxamento mediado por estímulo elétrico (**B**), acetilcolina (**C**) e nitroprussiato de sódio (**D**) em tiras de CC de camundongos uninefrectomizados ou DOCA/sal tratados com veículo ou BE0075-1 96

29 Análise temporal da pressão arterial sistólica, em camundongos WT ou RAG-1$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal 97

30	Análise densitométrica da IL-1β (**A**), pró-IL-1β (**B**), caspase-1 (**C**) e pró-caspase-1 (**D**) no CC de camundongos WT e RAG-1$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal	**99**
31	Traçado representativo da pressão arterial e da pressão intracavernosa de camundongos WT ou RAG-1$^{-/-}$ uninefrectomizados ou DOCA/sal. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal.	**101**
32	Curvas concentração-efeito para fenilefrina (**A**), relaxamento mediado por estímulo elétrico (**B**), acetilcolina (**C**) e nitroprussiato de sódio (**D**) em tiras de CC de camundongos WT ou RAG-1$^{-/-}$ uninefrectomizados ou DOCA/sal	**103**

LISTA DE TABELAS

TABELA	TÍTULO	PÁGINA
1	Anticorpos utilizados	58
2	Kits utilizados para quantificação dos níveis de citocinas, CCL2 no CC e ET-1 no soro de camundongos	59
3	Anticorpos utilizados para marcação de ICAM-1 e VCAM-1 no CC	60
4	Anticorpos utilizados para citometria de fluxo no CC	62
5	Valores de Emax (%) e pEC_{50} das curvas de concentração-efeito para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio no CC de camundongos controles ou DOCA/sal	74
6	Valores de Emax (%) e pEC_{50} das curvas de concentração-efeito para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio no CC de camundongos WT ou $NLRP3^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal	83
7	Valores de Emax (%) e pEC_{50} para as curvas de concentração efeito para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio no CC de camundongos uninefrectomizados ou DOCA/sal	95
8	Valores de Emax (%) e pEC_{50} para as curvas de concentração efeito para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio no CC de camundongos uninefrectomizados ou DOCA/sal	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA – Análise de variância

- AIM2 – ausência de melanoma 2

- ASC – Proteína do tipo espécie apoptótica contendo um domínio CARD (*apoptosis speck-like protein containing a CARD domain*)

- ATP – Adenosina trifosfato

- AVE – Acidente vascular encefálico

- Ca^{2+} – Cálcio.

- CARD – Domínio recrutador de caspase (*caspase recruitment domain*)

- CC – Corpo cavernoso

- cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina (*cyclic adenosine monophosphate*)

- cGMP – Monofosfato cíclico de guanosina (*cyclic guanosine monophosphate*)

- CMLV – Célula de músculo liso vascular

- CO_2 – Dióxido de carbono

- COX – Ciclooxigenase

- DAG – Diacilglicerol

- DAMPs – Padrões moleculares associados ao dano (*damage-associated molecular patterns*)

- DCV – Doenças cardiovasculares

- DM – Diabetes mellitus

- DE – Disfunção erétil

- DOCA – Acetato de desoxicorticosterona

- DRC – Doença renal crônica

- ECE – Estímulo por campo elétrico.

- EDCF - Fator contrátil derivado do endotélio (*endothelium-derived contracting factor*)

- EDRF – Fator relaxante derivado do endotélio (*endothelium-derived relaxing factor*)

- EDTA – etilenodiaminotetracético

- ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima

- eNOS – Sintase de óxido nítrico endotelial.

- ET – Endotelina

- ET-1 – Endotelina-1

- ET_A – Receptor para endotelina do subtipo A

- ET_B – Receptor para endotelina do subtipo B

- EV – Endotélio vascular

- GTP – Trifosfato de guanosina (*guanosine 5´-triphosphate*)

- H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

- HDL – Lipoproteínas de alta densidade (*high-density lipoprotein*)

- IAM – Infarto agudo do miocárdio

- IL – Interleucina

- IC – Insuficiência cardíaca

- ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1 (*intercellular adhesion molecule-1*)

- IP_3 – Trifosfato de inositol (*inositol triphosphate*)

- K^+ – Potássio.

- KCl – Cloreto de potássio

- K_{Ca} – Canais para potássio ativados por cálcio

- LRR – Domínios ricos em repetição de leucina (*leucine-rich repeat*)

- LSAB – estreptavidina biotinilada (*labeled streptavidin biotin)*

- MCP-1 – Proteína quimioatrativa de monócitos-1 (*monocyte chemotactic protein-1)*

- MIP-1α - proteína inflamatória de macrófagos-1α (*monocyte Inflammatory protein-1α*)

- MLC – Cadeia leve de miosina (*myosin light-chain*)

- MLCC – Músculo liso do corpo cavernoso.

- MLCK – Cinase de cadeia leve de miosina (*myosin light-chain kinase*).

- NA - Noradrenalina

- NaCl – Cloreto de sódio

- Na_3VO_4 – ortovanadato de sódio.

- NaCl – Cloreto de sódio.

- NAD(P)H – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

- NaF – Fluoreto de sódio

- NANC – Não-adrenérgico não-colinérgico

- NETs – *Neutrophils extracelular traps*

- NOD – Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (*Nucleotide binding and oligomerization domain*)

- NF-κB – Fator nuclear-κB (*nuclear factor-κB*).

- NLR – Receptores do tipo domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (*nucleotide binding and oligomerization domain-like receptors*)

- NLRC4 – NOD, LRR e contendo CARD 4

- NLRP - Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos contendo domínios ricos em repetição de leucina e domínio pirina (*Nucleotide binding and oligomerization domain containing leucine-rich repeat and pyrin domain*).

- nNOS – Sintase de óxido nítrico neuronal

- NPM – Neutrófilos polimorfonucleares

- NO – Óxido nítrico.

- O_2^- - Ânion superóxido

- P2X7 – Receptor purinérgico 7

- PA – Pressão arterial

- PACAP – Polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase (*pituitary adenyl cyclase activating polypeptide*)

- PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)

- PBS – Tampão fosfato (*Phosphate buffer*)

- PAM – Pressão arterial média

- PC-PLD – Fosfolipase específica para fosfatidil colina (*phosphatidyl choline-specific phospholipase D*)

- PDE – Fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (*Cyclic nucleotide phosphodiesterases*).

- PIC – Pressão intracavernosa

- PIP_2 – Fosfoinositol 4,5 bifosfato (*phosphoinositol 4,5 bisphosphate*)

- PI-PLC – Fosfolipase específica para fosfatidil inositol (*phosphatidyl inositol specific phospholipase C*)

- PKA – Proteína cinase A (*protein kinase A*)

- PKC – Proteína cinase C (*protein kinase C*)

- PKG – Proteína cinase G dependente de monofosfato cíclico de guanosina (*cGMP-dependent protein kinase G*).

- PMA – acetato miristato de forbol (*Phorbol 12-Myristate 13 acetate*)

- PRR – Receptor de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors*)

- PTK – Proteínas tirosina cinases (*protein tyrosine kinase*)

- PYD – Pirina (pyrin).

- RhoK – Rho cinase (*Rho kinase*)

- ROS – Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

- SOD – Superóxido dismutase

- TGF-β – Fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor-beta*)

-Th – Célula T auxiliar (*T helper*)

- TK – Tirosina cinase (*tyrosine kinase*)

- TLR – Receptor do tipo Toll (*Toll-like receptor*)

- TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

- TXNIP – proteína que interage com tioredoxina (*thioredoxin-interactin protein*)

- VCAM-1 – Molécula de adesão celular vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*)

- VIP – Peptídeo intestinal vasoativo (*vasoactive intestinal peptide*)

- WT – Camundongos C57BL/6

SUMÁRIO

1. Introdução 28
1.1. Hipertensão arterial 28
1.1.1. Definição da Hipertensão arterial 28
1.1.2. Hipertensão DOCA/sal 29
1.2. A ereção 30
1.2.1. Anatomia peniana 30
1.2.2. Fisiologia da ereção 33
1.2.3. Bases moleculares envolvidas no controle periférico da ereção 34
1.2.4. Disfunção erétil 36
1.3. Endotelina-1 37
1.3.1. História 37
1.3.2. Síntese da ET-1 38
1.3.3. Receptores para ET-1 40
1.3.4. Mecanismo de ação da ET-1 40
1.3.5. Papel da ET-1 na disfunção erétil 41
1.3.6. Papel da ET-1 na modulação da inflamação crônica 43
1.4. NLRP3 45
1.4.1. O sistema imune 45
1.4.2. Receptores de reconhecimento de padão 46
1.4.3. O inflamassoma 46
1.4.4. Mediadores envolvidos na ativação do NLRP3 48
1.4.5. Importância do NLRP3 no sistema cardiovascular 50
2. Hipótese 52
3. Objetivo 52
3.1. Objetivos específicos 52
4. Materiais e métodos 54
4.1. Animais 54
4.2. Hipertensão DOCA/sal e medidas da pressão arterial 54
4.3. Medidas da pressão intracavernosa e pressão arterial média 54

4.4. Participação do NLRP3 no efeito agudo da ET-1 sobre a PIC/PAM 55
4.5. Estudo funcional de tiras do CC 56
4.6. Western Blotting 56
4.6.1. Extração de proteínas 56
4.6.2. Dosagem de proteínas 57
4.6.3. Eletroforese e transferência para membrana de nitrocelulose 57
4.7. Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) 58
4.8. Imunofluorescência 59
4.9. Imuno-histoquímica 59
4.9.1. Análise semi-quantitativa da expressão de VCAM-1, ICAM-1 e picrossirius 60
4.10. Citometria de fluxo e análise 60
4.11. Análise estatística 62
5. Resultados 64
5.1. A ET-1 aumenta a pressão arterial em camundongos com hipertensão DOCA/sal 64
5.2. A ET-1 aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da caspase-1 no CC de camundongos com hipertensão DOCA/sal 65
5.3. A ET-1 prejudica a função erétil em camundongos com hipertensão DOCA/sal 70
5.4. O NLRP3 medeia o efeito agudo da ET-1 sobre a função erétil em camundongos 72
5.5. A ET-1 prejudica a reatividade do CC em camundongos com hipertensão DOCA/sal 73
5.6. O aumento na pressão arterial de camundongos com hipertensão DOCA/sal depende do NLRP3 76
5.7. O aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da caspase-1 em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende do NLRP3 76

5.8. O prejuízo na função erétil e na reatividade do CC em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da atividade do NLRP3 81
5.9. O NLRP3 medeia o recrutamento de neutrófilos e linfócitos Th1 induzido pela ET-1 no CC de camundongos hipertensos DOCA/sal 85
5.10. O NLRP3 medeia o aumento na expressão de VCAM-1, ICAM-1 e CCL2 induzido pela ET-1 no CC de camundongos hipertensos DOCA/sal 87
5.11. O aumento na pressão arterial em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da ação de neutrófilos 89
5.12. A atividade do NLRP3, modulada pela ET-1, no CC medeia o aumento na expressão de VCAM-1, ICAM-1 e CCL2. 91
5.13. O aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da caspase-1 no CC de camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da ação de neutrófilos 91
5.14. A ação de neutrófilos prejudica a função erétil e a reatividade do CC em camundongos com hipertensão DOCA/sal 93
5.15. O aumento na pressão arterial em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da ação de linfócitos 97
5.16. O aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da caspase-1 em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da ação de linfócitos 97
5.17. A ação de linfócitos altera a função erétil e a reatividade do CC em camundongos com hipertensão DOCA/sal 100
6. Discussão 104
7. Conclusão 114
8. Referências 115
9. Anexos 141

1. Introdução

1.1. Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é considerada um crescente problema de saúde pública, particularmente em países em desenvolvimento. Estima-se que há uma prevalência de 37% de hipertensão arterial em países em desenvolvimento. Enquanto, que em países desenvolvidos há 23% (Kearney *et al.*, 2005). Este quadro está intimamente relacionado com a piora na qualidade de vida e morte de milhões de pessoas no mundo. A incidência da hipertensão arterial vem avançando em larga escala nas últimas décadas, e consequentemente, o número de mortes associadas aumentou de 1990 até 2010 (Lim *et al.*, 2012).

Projeções indicam que até 2025, 75% de todas as pessoas com elevada pressão arterial no mundo (1.17 bilhão) estarão vivendo em países emergentes (Kearney *et al.*, 2005). Além disso, a hipertensão arterial prevalece em cerca de 30 a 45% em adultos (acima de 18 anos), e esta condição é agravada com o envelhecimento (Lewington *et al.*, 2002). Isto ocorre devido a alterações funcionais, como redução na distensibilidade dos vasos sanguíneos, desregulação autonômica, disfunção renal progressiva, entre outras. Estes fatores podem elevar a pressão arterial e também elevar a demanda de oxigênio pelo coração (Lewington *et al.*, 2002; Aronow *et al.*, 2011).

A hipertensão arterial é um enorme fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, contribuindo assim para maior morbidade e mortalidade destas doenças no mundo (Messerli *et al.*, 2007). Além disso, já foi demonstrado que a hipertensão arterial está vinculada com a gênese e progressão da insuficiência cardíaca, doença renal crônica e disfunção erétil (DE) (Lewington *et al.*, 2002; Messerli *et al.*, 2007; Aronow *et al.*, 2011).

1.1.1. Definição da Hipertensão arterial

É definido como pré-hipertensão uma condição caracterizada por pressão arterial (PA) sistólica entre 121 e 139 e/ou PA diastólica entre 81 e 89 mmHg (Malachias *et al.*, 2016).

A hipertensão arterial, segundo as diretrizes da sociedade brasileira de cardiologia, é caracterizada por elevação sustentada dos níveis pressóricos sistólicos ≥ 140 e/ou diastólicos ≥ 90 mmHg. Frequentemente, a hipertensão arterial se associa

a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, sendo agravada pela presença de outros fatores de risco, como dislipidemia, obesidade abdominal, intolerância à glicose e diabetes mellitus (DM). Além disso, a hipertensão arterial mantém associação independente com eventos como morte súbita, acidente vascular encefálico (AVE), infarto agudo do miocárdio (IAM), insuficiência cardíaca (IC), doença arterial periférica e doença renal crônica (DRC), fatal e não-fatal (Malachias *et al.*, 2016).

1.1.2. Hipertensão DOCA/sal

O modelo DOCA/sal foi utilizado pela primeira vez para estudar a hipertensão em 1970. Neste modelo, o acetato de desoxicorticosterona (DOCA) é administrado no animal. A administração de DOCA altera o equilíbrio hidroeletrolítico, alterando as taxas de absorção de água e sódio pelos rins, o que resulta em expansão de volume sanguíneo (Anderson *et al.*, 1988; Zicha *et al.*, 1989). Adicionalmente, neste modelo há retirada de um dos rins do animal e também utiliza-se de dieta rica em sódio. Desta forma, os animais recebem de 0,6 a 1% de cloreto de sódio (NaCl), afim de elevar a pressão arterial, e 0,2 % de cloreto de potássio (KCl) na água de beber (Zicha *et al.*, 1989; Grobe *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2013).

A sensibilidade ao sal tem um papel crucial no desenvolvimento da hipertensão essencial. Está presente em 26% de normotensos e 51% de hipertensos na população. Portanto, a sensibilidade ao sal constitui-se um fator crucial para o desenvolvimento da hipertensão (Weinberger *et al.*, 1986). Interessantemente, a renina, uma enzima responsável por converter angiotensinogênio em angiotensina I, sofre redução na hipertensão arterial em humanos (Poch *et al.*, 2001). Este fenômeno é importante no modelo de hipertensão DOCA/sal em animais, pois indica que o modelo não somente incorporou a dieta rica em sódio, mas também resultou em hipertensão associada a baixa de renina, fato similar ao observado na população (Funder e New, 2008).

A combinação da administração de DOCA, uninefrectomização e aumento no consumo de sal resulta em elevação crônica da pressão arterial em estágios distintos. O modelo de hipertensão DOCA/sal possui majoritariamente 2 fases distintas, caracterizadas pelo aumento inicial na pressão arterial nos primeiros dias até atingir um platô. Em seguida, os animais passam a apresentar a pressão arterial elevada e sustentada por semanas (Abrams *et al.*, 2010).

Além disso, a hipertensão arterial está frequentemente associada a gênese ou progressão da DE (Muller e Mulhall, 2006; Shabsigh *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2011). Há uma alta prevalência da DE em indivíduos hipertensos e o tratamento com anti-hipertensivos também contribui com a DE (Keene e Davies, 1999). Além disso, o modelo de hipertensão DOCA/sal está intimamente relacionado com a gênese da DE, caracterizada pela redução na relação entre pressão intracavernosa e pressão arterial média (PIC/PAM) em ratos (Chitaley, Webb*, et al.*, 2001). Ademais, a hipertensão e a DE no modelo DOCA/sal parecem estar intimamente relacionadas ao aumento da expressão de endotelina-1 (ET-1) (Carneiro, Nunes*, et al.*, 2008) e marcadores pró-inflamatórios (Krishnan *et al.*, 2016; Krishnan *et al.*, 2019).

1.2. A ereção

A ereção é um evento neurovascular, sujeito a modificações pelo sistema nervoso central e fatores endócrinos. A experiência sexual satisfatória é percebida pela mente, sendo subjetiva e modificada através de processos conscientes e inconscientes. As percepções do homem de suas necessidades de parceria e expectativas também têm influência. Assim, a ereção é essencialmente um reflexo espinhal que pode ser iniciado por recrutamento de impulsos aferentes do pênis, mas também por estímulos visuais, olfativos e imaginários como resultado final de uma integração complexa de sinais (Cirino *et al.*, 2006).

1.2.1. Anatomia peniana

O pênis é composto por três estruturas cilíndricas, dois corpos cavernosos, envolvidos pela túnica albugínea, e o corpo esponjoso disposto ventralmente (**Figura 1**). Os corpos cavernosos são envolvidos pela fáscia de Buck, a qual contém a veia dorsal profunda e muitos nervos sensoriais (Eardley e Sethia, 2003).

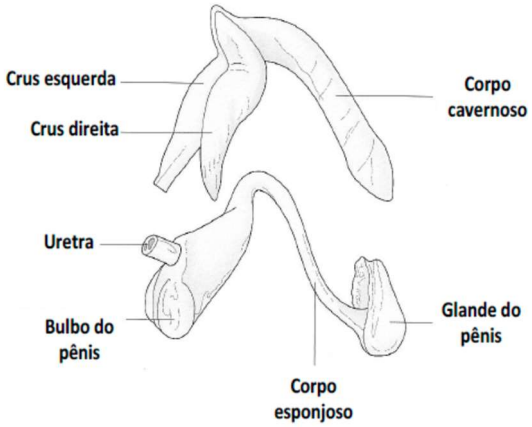


Figura 1. Estrutura anatômica do pênis. As estruturas principais são representadas pela base, corpo e glande. Figura adaptada (Eardley e Sethia, 2003)

O influxo sanguíneo ao corpo cavernoso (CC) é provido, principalmente, pelas artérias cavernosas, via artéria pudenda interna (**figura 2A**). Os ramos das artérias cavernosas formam as artérias helicoidais, as quais se abrem diretamente para os espaços cavernosos, que contém uma rede de comunicação com o plexo venoso subtúnico. Estas, por sua vez, formam as veias de maior calibre que, por fim, são drenadas pelas veias dorsal profunda, cavernosas e crurais (Ritchie e Sullivan, 2011) (**figura 2B**).

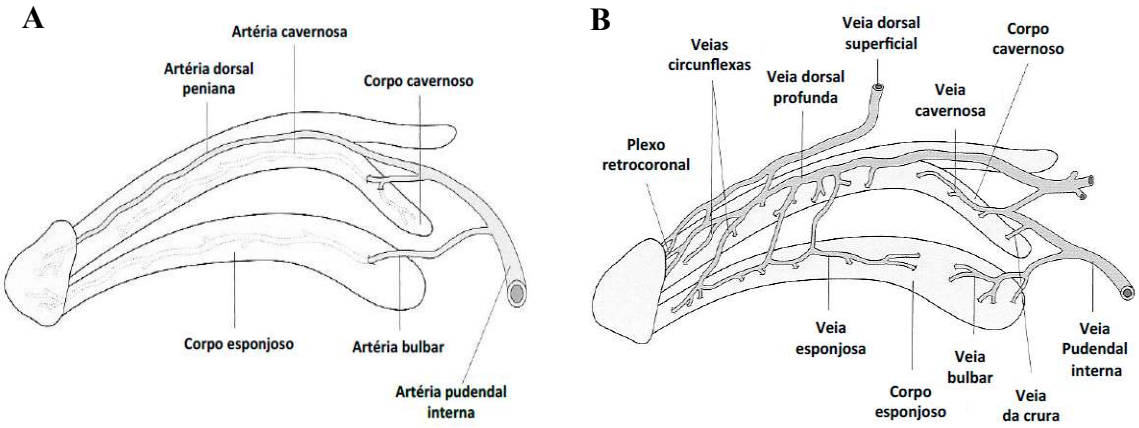


Figura 2. Irrigação arterial (A) e retorno venoso (B) do pênis. Figura adaptada (Eardley e Sethia, 2003)

Os vasos sanguíneos e o músculo liso do CC (MLCC) recebem inervações que se originam de neurônios da medula espinhal e dos gânglios periféricos, as inervações simpáticas e parassimpáticas se fundem para formar o nervo cavernoso, o qual penetra nos corpos cavernosos e esponjosos para promover os eventos neuro-vasculares durante a ereção e detumescência. Os nervos somáticos são

primariamente responsáveis pelas sensações e pela contração dos músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso (Dean e Lue, 2005) (**figura 3**).

A via simpática, constituída principalmente por nervos adrenérgicos (Ritchie e Sullivan, 2011), origina-se a partir do 11º segmento torácico e do 2º lombar, passa através do ramo ventral do nervo espinhal (ramo branco) para a cadeia ganglionar simpática. Algumas fibras trafegam através dos nervos esplênicos para os plexos hipogástrico superior e mesentérico inferior, através do nervo hipogástrico, em direção ao plexo pélvico. Em humanos, os segmentos torácicos de 10 ao 12, frequentemente, dão origem às fibras simpáticas e a cadeia de células ganglionares que se projetam para o pênis estão localizadas nos gânglios sacral e caudal (Dean e Lue, 2005) (**figura 3**).

A via parassimpática, mediada principalmente por nervos colinérgicos e não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC) (Ritchie e Sullivan, 2011), origina-se de neurônios da coluna intermediolateral de células do 2º, 3º e 4º segmentos sacrais. As fibras pré-ganglionares passam pelos nervos pélvicos para o plexo pélvico, juntam-se as fibras simpáticas vindas do plexo hipogástrico para formar os nervos cavernosos. A estimulação do plexo pélvico e do nervo cavernoso induz ereção, enquanto a estimulação do tronco simpático causa detumescência (Dean e Lue, 2005) (**figura 3**).

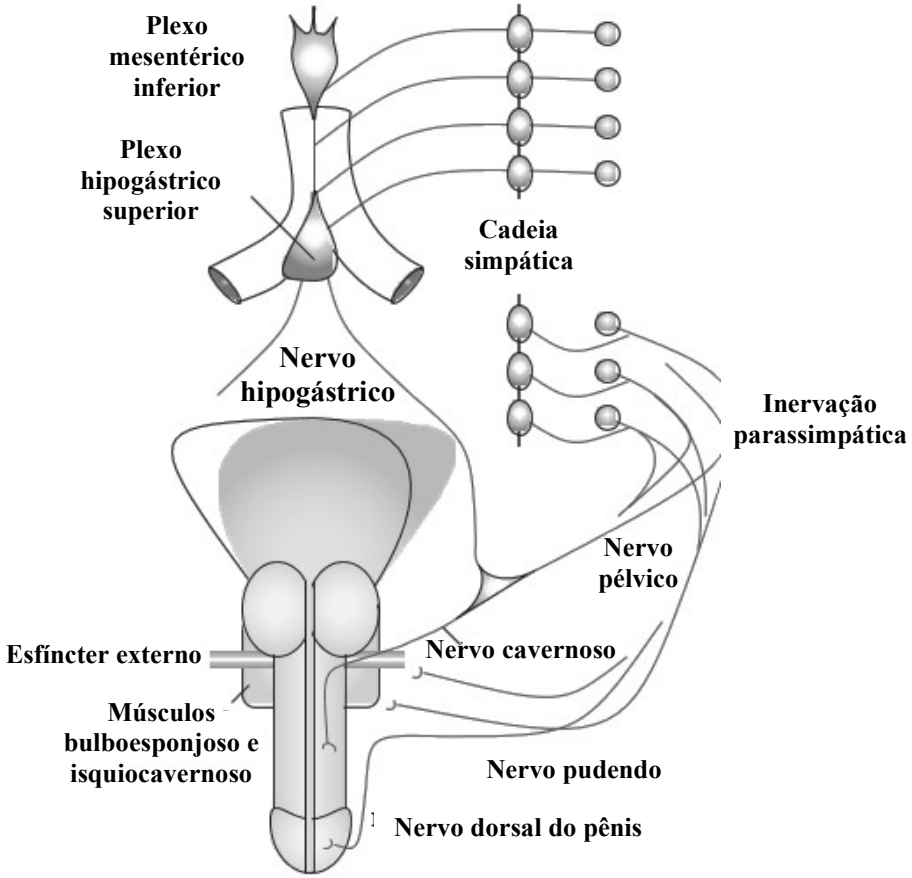


Figura 3. Inervação do pênis. Figura adaptada (Brackett *et al.*, 2010)

1.2.2. Fisiologia da ereção

A ereção peniana é determinada por mudanças de pressão nos sinusóides do CC. A vasculatura do tecido erétil difere de vários leitos vasculares por ser composta de arteríolas e espaços sinusóides preenchidos por sangue, onde ambos são delineados por células de músculo liso e endoteliais. Durante o estímulo sexual ou tumescência relacionada ao sono, a liberação de óxido nítrico (NO), predominantemente, pela ativação da sintase de NO neuronal (nNOS), presente em terminações nervosas NANC, e da sintase de NO endotelial (eNOS), nas células endoteliais locais, estimula o relaxamento das células de músculo liso dos vasos e do CC (Dail *et al.*, 1995; Leite *et al.*, 2007; Priviero *et al.*, 2007).

A dilatação das arteríolas e dos sinusóides do CC resulta em aumento do fluxo sanguíneo, impulsionado pela força da pressão arterial, e subsequente elevação da pressão intracavernosa. A resposta erétil segue como consequência da pressão intracavernosa elevada que provoca expansão da túnica albugínea externa, o que resulta em aumento do comprimento e diâmetro do pênis, característicos da ereção **(figura 4).**

Na ausência de estímulo sexual, a contração da vasculatura e do CC mantém o pênis no estado flácido. A contração do CC é principalmente determinada em resposta à noradrenalina (NA), liberada de terminais nervosos simpáticos, e à ET-1. Essa contração estreita o lúmen arteriolar e as cavidades sinusoidais e restringe o fluxo sanguíneo para manter uma baixa pressão intracavernosa e, consequentemente, o pênis no estado flácido (Dail *et al.*, 1995; Leite *et al.*, 2007; Priviero *et al.*, 2007) **(figura 4).**

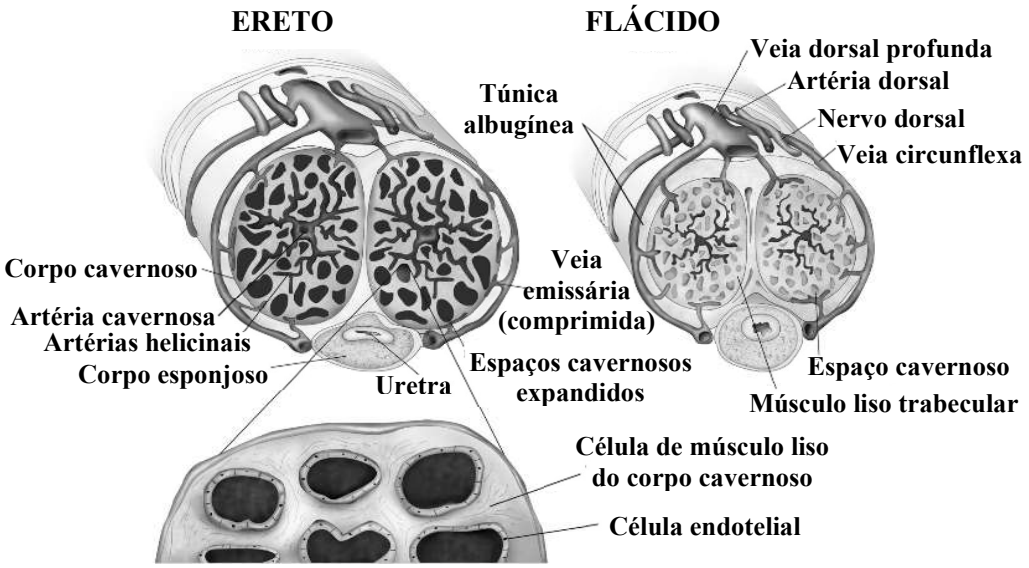


Figura 4. Estrutura anatômica do corpo cavernoso. Anatomia da secção transversal do pênis humano no estado flácido e ereto. O diagrama aproximado mostra como as células endoteliais alinham-se nos espaços cavernosos, que por sua vez são cercados por uma rede de músculo liso. Figura adaptada (Ritchie e Sullivan, 2011).

1.2.3. Bases moleculares envolvidas no controle periférico da ereção

A ereção depende, principalmente, do NO liberado dos terminais nervosos parassimpáticos ou do endotélio, que se difunde para o músculo liso vascular ou trabecular. Uma vez no músculo liso, o NO estimula a enzima guanilato ciclase a aumentar os níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (*cyclic guanosine monophosphate* – cGMP), o qual leva à ativação da proteína cinase G dependente de cGMP (*cGMP-dependent protein kinase G* – PKG) (Andersson e Wagner, 1995; Saenz De Tejada *et al.*, 2004). A PKG estimulada pelo cGMP reduz a concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular e/ou a sensibilidade de proteínas contráteis ao Ca^{2+}, o que leva ao relaxamento do músculo liso. Além disso, a PKG reduz os

níveis intracelulares de Ca^{2+} através da fosforilação de canais iônicos, que diminui o influxo ou inibe a liberação de Ca^{2+} intracelular (Schlossmann *et al.*, 2003).

A ativação de canais para potássio (K^+) é um poderoso mecanismo de hiperpolarização do músculo liso vascular que leva ao relaxamento. Assim como o cGMP, o monofosfato cíclico de adenosina (*cyclic adenosine monophosphate* – cAMP) modula a atividade dos canais para K^+ que levam a vasodilatação (Schlossmann *et al.*, 2003). Canais para potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) são ativados por Ca^{2+} intracelular, e são responsáveis pela manutenção do tônus basal no CC (Simonsen *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 2006).

As fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (*Cyclic nucleotide phosphodiesterases* - PDEs) formam uma superfamília de enzimas hidrolíticas que degradam cGMP e cAMP e eliminam assim suas ações biológicas. A PDE5 é a principal enzima catalítica do cGMP no MLCC (Moreland *et al.*, 2001; Seftel, 2005).

A fase de detumescência depende, principalmente, da elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+}, considerado como clássico acionador da contração do músculo liso, promove a ativação da cinase de cadeia leve de miosina (*myosin light-chain kinase* – MLCK) que leva à fosforilação da cadeia leve de miosina (*myosin light-chain* – MLC). Entretanto, este mecanismo não é o único responsável pela contração do músculo liso, existem diversas cinases, como proteína cinase C (*protein kinase C* – PKC), tirosina cinase (*tyrosine kinase* – TKs) e Rho cinase (*Rho kinase* – RhoK) (47). RhoA é um membro da superfamília Ras, de pequenas proteínas ligadas ao trifosfato de guanosina (*guanosine 5´-triphosphate* – GTP), e RhoK é uma cinase que é ativada por RhoA através da fosforilação de seus resíduos de serina/treonina (Somlyo e Somlyo, 2000).

A atividade da RhoA/RhoK possui uma grande importância na regulação da contratilidade do CC e manutenção do estado flácido do pênis (Chitaley, Wingard*, et al.*, 2001). Pois, a inibição MLC, por mecanismos independentes de Ca^{2+}, resulta na manutenção da fosforilação da MLC (Somlyo e Somlyo, 2000). A ligação de agonistas contráteis a receptores acoplados a proteína G, frequentemente, estimula ambos os mecanismos, a entrada e a mobilização das reservas intracelulares de Ca^{2+} (Mcfadzean e Gibson, 2002; Berridge *et al.*, 2003).

1.2.4. Disfunção Erétil

A DE é definida como a incapacidade de alcançar ou manter a ereção peniana por tempo suficiente para um desempenho sexual satisfatório (NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence, 1993). É considerada uma desordem comum, que afeta 52% dos homens com idade entre 40 e 70 anos (Feldman *et al.*, 1994). Além disso, a DE é um fator agravante para redução da qualidade de vida e morbidade psicossocial para homens sexualmente ativos. A DE afeta mais de 30 milhões de indivíduos nos EUA (Lue, 2000), tornando-se assim um problema de saúde pública. A prevalência da DE é muito alta, com previsão de aumentar consideravelmente nos próximos 10 anos, podendo afetar mais de 300 milhões de homens em todo mundo até 2025 (Ayta *et al.*, 1999).

A DE possui uma prevalência de cerca de 20 a 30% da população geral na sociedade ocidental, atinge mais de 50% dos pacientes com alto risco de eventos cardiovasculares. Isso indica que há uma forte associação entre fatores de risco cardiovasculares, especialmente hipertensão arterial, dislipidemia e DM (Esposito *et al.*, 2004). Uma possível explicação para tal fato seria que a vasculatura e o pênis apresentam mecanismos hemodinâmicos comuns (Shabsigh *et al.*, 2005). A maioria dos pacientes com DE apresentam pelo menos um fator de risco para desenvolver DCV. Portanto, a DE pode ser um importante preditor para doenças vasculares sistêmicas (Shabsigh *et al.*, 2004; Gandaglia *et al.*, 2014).

A gênese da DE pode ser classificada como de origem psicossocial, neurológica, hormonal, por doenças vasculares ou pela combinação destes fatores (Lue, 2000). Doenças vasculares do pênis são as causas mais comuns de DE e podem envolver diversos mecanismos fisiopatológicos, como: a disfunção endotelial, o prejuízo no influxo arterial, a diminuição no relaxamento ou aumento da contração do MLCC, isquemia crônica induzida pelo aumento da contração do MLCC, fibrose, disfunção veno-oclusiva ou hipoxemia crônica (Kirby *et al.*, 2001; Gratzke *et al.*, 2010).

Blans *et al.* (2006) demonstraram que o aumento da proteína C reativa está frequentemente associado a DE em pacientes com diabetes, comprovando assim que o processo inflamatório possui um papel importante na DE. Adicionalmente, Carneiro *et al.* (2009) mostraram que o fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor – TNF-α) exerce um papel em detrimento da ereção. Posteriormente, constatou-se que existe uma correlação entre a DE e níveis subclínicos de mediadores inflamatórios

(Arana Rosainz Mde *et al.*, 2011). Ademais, O aumento do processo inflamatório crônico, envolvendo receptores do tipo toll, que pertencem ao sistema imune inato, está fortemente envolvido com o surgimento da DE (Stallmann-Jorgensen *et al.*, 2015).

1.3. Endotelina-1

1.3.1. História

Antes da década de 80 acreditava-se que o endotélio vascular (EV) era meramente uma barreira física passiva, entre o sangue e os tecidos. Entretanto, nas últimas décadas muito foi descoberto sobre o seu papel como modulador da função vascular (Hickey *et al.*, 1985). O EV regula a função vascular através da produção e liberação de diversos fatores vasoativos que atuam diretamente nas células endoteliais, ou de forma autócrina ou parácrina em outras células vasculares.

Este conceito surgiu após a descoberta do fator relaxante derivado do endotélio (*endothelium-derived relaxing factor* – EDRF) por Furchgott e Zawadzki (1980). Com a descoberta deste fator relaxante deu-se início a um aumento na pesquisa mundial relacionada a função do endotélio, o que levou a caracterização do EDRF na década de 80 (Fleming e Busse, 1999). Hickey *et al.* (1985) encontraram um fator contrátil derivado do endotélio (*endothelium-derived contracting factor* – EDCF). Subsequentemente, Yanagisawa *et al.* (1988) iniciaram seu trabalho na purificação do EDCF. Em 1988, este fator foi purificado com sucesso e identificado como um novo peptídeo, recebendo o nome de endotelina (ET).

A ET foi originalmente isolada e identificada no meio de cultura de células endoteliais de suínos. É um potente peptídeo vasoconstritor que compreende 21 resíduos de aminoácidos. A descoberta da ET estimulou o interesse mundial, devido ao seu efeito vasoconstritor potente e sustentado em leitos vasculares isolados, além do efeito vasopressor sustentado. Logo após a sua descoberta, a análise do gene que a codificava revelou a existência de dois outros genes que codificavam peptídeos similares à ET. As sequências de aminoácidos mostraram-se muito similares aos encontrados na ET, sendo estas três isoformas endógenas nomeadas como ET-1, ET-2 e ET-3 (**figura 5**) (Inoue *et al.*, 1989).

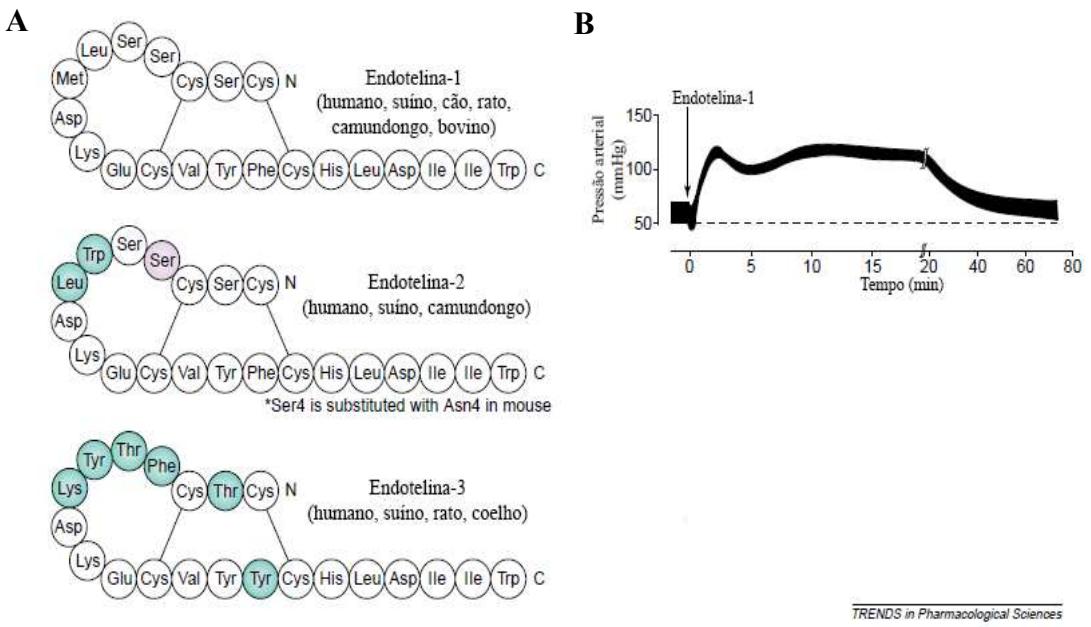


Figura 5: **Estrutura dos 3 isopeptídeos da ET (A) e efeito da ET-1 na pressão arterial (B)**. Figura adaptada (MASAKI, 2004).

1.3.2. Síntese da ET-1

Como dito anteriormente, a ET-1 é o principal membro da família das ETs, é um peptídeo constituído de 21 aminoácidos com uma porção C-terminal hidrofóbica e 2 pontes de cisteína na porção N-terminal. A ET-2 e ET-3 diferem respectivamente por 2 e 6 aminoácidos (Yanagisawa e Masaki, 1989). A ET-1 é produzida por células endoteliais e de músculo liso vascular, células epiteliais das vias aéreas, macrófagos, fibroblastos, cardiomiócitos, neurônios cerebrais, e ilhotas pancreáticas (Ortmann *et al.*, 2005).

Os precursores da ET-1 são processados por duas proteases para chegar a sua forma ativa madura. As pré-pró-endotelinas são peptídeos constituídos de 212 resíduos de aminoácidos, são clivados em seus sítios dibásicos por endoproteases do tipo furinas para formar seus intermediários biologicamente inativos, peptídeos com 37 ou 41 aminoácidos chamados de big-endotelinas ou pró-endotelinas. O processo de maturação da ET-1 é promovido principalmente por enzimas conversoras de ET, que são membros de uma família de metaloproteases de zinco ligadas a membrana, da família das neprisilinas (Kedzierski e Yanagisawa, 2001).

Existem duas vias principais de secreção da ET. Uma via envolve a secreção em grânulos secretores, também conhecidos como corpos de Weibel-Palade, que

servem como armazenamento para ET-1. Uma vez que as células endoteliais são ativadas, os corpos de Weibel-Palade se realocam e se fundem com a membrana plasmática, assim seu conteúdo é liberado por exocitose (Van Mourik *et al.*, 2002). Este processo é tipicamente ativado por hipotermia, estresse mecânico e através da ação de agonistas como a histamina e a trombina (Macarthur *et al.*, 1994; Yoshitomi *et al.*, 1998).

A segunda via é constitutiva e ocorre na maioria das células produtoras de ET. Esta via promove uma maior liberação de ET-1 do que através de grânulos secretórios. No entanto, muitas células produtoras de ET-1, como algumas células endoteliais são deficientes desta via. Portanto, a regulação dos níveis de ET-1 nestas células ocorre pela síntese, particularmente na transcrição. Em contrapartida, a via constitutiva parece ser a mais importante para a manutenção do tônus vascular (Russell e Davenport, 1999).

A ET-1 sintetizada por células endoteliais é liberada através do lado basolateral, atua diretamente nas células de músculo liso vascular (CMLV). Portanto, os níveis de ET-1 são comumente maiores em tecidos do que no plasma, e mudanças do nível de ET-1 no plasma em resposta a diversos estímulos é muito lenta. Os níveis plasmáticos de ET-1 variam entre 1 e 10 pmol/L. Interessantemente, níveis plasmáticos abaixo de 1 pmol/L podem promover vasoconstrição (Haynes e Webb, 1994). Dessa forma, os níveis circulantes da ET-1 provavelmente não refletem seu efeito fisiológico.

A ET-1 tem uma meia-vida curta no sangue, sendo rapidamente absorvida na vasculatura pulmonar. A secreção de ET-1 acima dos níveis basais leva em torno de duas a cinco horas (Haynes e Webb, 1998), devido ao mecanismo pelo qual a ET-1 é sintetizada e liberada. Portanto, a ET-1 é considerada um peptídeo com ações primariamente autócrinas ou parácrinas ao invés de endócrinas (Wagner *et al.*, 1992).

A síntese e liberação da ET-1 dá-se principalmente em função do fluxo sanguíneo. Os chamados “receptores para o estresse de cisalhamento” em células endoteliais são ativados em resposta a vasoconstrição como resultado da diminuição do fluxo sanguíneo, aumentam assim a produção e liberação de NO e reduz a produção de ET-1. O estresse de cisalhamento e o estiramento são responsáveis, respectivamente, por diminuir e aumentar o RNA mensageiro para pré-pró-ET-1 em células endoteliais (Malek *et al.*, 1999).

A produção de ET-1 é regulada também por diversos outros fatores, que podem incluir citocinas, como o fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor-beta* – TGF-β), TNF-α, interleucinas (IL), insulina, NA, angiotensina II e trombina (Yanagisawa *et al.*, 1988; Emori *et al.*, 1992). O NO, a prostaciclina e o peptídeo natriurético são responsáveis por reduzir a produção de ET-1 em células endoteliais (Prins *et al.*, 1994; Redmond *et al.*, 1996).

1.3.3. Receptores para ET-1

Existem dois receptores para ET-1, denominados ET_A e ET_B. Estes receptores possuem 7 domínios transmembrana e são acoplados à proteína G. Estes receptores medeiam os efeitos que a ET-1 exerce em funções como a diurese (Kohan e Barton, 2014).

A afinidade da ET-1 e ET-2 pelo receptor ET_A encontra-se em concentrações picomolares, ao passo que da ET-3 é 100 vezes menor (Kedzierski e Yanagisawa, 2001), 2001). O efeito da ET-1 sobre o ET_A é vasoconstritor e promotor de crescimento.

Os três peptídeos da ET possuem afinidade em concentrações picomolares para o receptor ET_B. O efeito da ET-1 sobre o ET_B é inibir o crescimento celular, vasoconstrição no sistema vascular e também funções de eliminação, inibindo o acúmulo de ET-1 no tecido (Luscher e Barton, 2000; Kedzierski e Yanagisawa, 2001). Este mecanismo de depuração tem extrema importância nos pulmões, pois eliminam cerca de 80% da ET-1 circulante (Luscher e Barton, 2000).

1.3.4. Mecanismo de ação da ET-1

A sinalização da ET-1 pode ocorrer através da ativação de receptores ET_A e ET_B. Classicamente, após ativar o receptor ET_A, este estimula a fosfolipase C (*phospholipase C* – PLC), leva a formação de trifosfato de inositol (*inositol triphosphate* – IP_3) e diacilglicerol (DAG) a partir de fosfoinositol 4,5 bifosfato (*phosphoinositol 4,5 bisphosphate* – PIP_2). O IP_3 então se difunde para os seus respectivos receptores no retículo sarcoplasmático e promove a liberação das reservas de Ca^{2+} para o citosol, promovendo um rápido aumento na concentração intracelular de Ca^{2+}, que por sua vez, leva à contração do músculo liso vascular (Simonson e Dunn, 1990). O efeito vasoconstritor da ET-1 permanece mesmo após a dissociação da ET-1 do receptor, podendo ser devido aos níveis de Ca^{2+}

permanecerem elevados no citosol (Chester *et al.*, 1989), ou devido a via de sinalização da ET-1 permanecer ativa por longos períodos (Clarke *et al.*, 1989).

Na via de sinalização não-clássica, a ET-1 estimula uma fosfolipase específica para fosfatidil colina (*phosphatidyl choline-specific phospholipase D* – PC-PLD) e fosfolipase específica para fosfatidil inositol (*phosphatidyl inositol specific phospholipase C* – PI-PLC), ambas ligadas ao receptor ET_A (Clerk e Sugden, 1997). Adicionalmente, a ET-1 estimula a produção de ácido araquidônico e liberação de prostaglandinas (Suzuki *et al.*, 1992), através da ativação da fosfolipase A_2 e aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . A ET-1 também estimula proteínas tirosina cinases (*protein tyrosine kinase* – PTK) como FAK e RAS (Nelson *et al.*, 2003), ativam assim a via RAF/MEK/MAPK, e subsequentemente estimulam a transcrição de protooncogenes, como c-FOS, c-MYC e c-JUN, promovendo assim crescimento celular e metástase.

A ET-1 promove a contração do músculo liso vascular também através de vias que não dependem do aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+}, através da estimulação de RhoK (Maekawa *et al.*, 1999), Raf-1 (Borman *et al.*, 2002) e cinase ligada a integrina (Muranyi *et al.*, 2002).

A ET-1 também estimula a produção de NO em células endoteliais, via ativação de receptores ET_B. Este mecanismo ocorre devido aos receptores ET_B ativarem PI3K/Akt, que por sua vez estimulam a fosforilação da eNOS (Herrera *et al.*, 2009). Interessantemente, o NO inibe a transcrição da pré-pró-ET-1 (Alonso e Radomski, 2003).

1.3.5. Papel da ET-1 na disfunção erétil

A ET-1 possui grande importância na manutenção do tônus vascular e também desempenha diferentes papéis na função erétil, como na manutenção do tônus do MLCC (Andersson e Wagner, 1995; Andersson, 2001; Ritchie e Sullivan, 2011), e isto é crucial na manutenção do estado flácido do pênis. É capaz de promover uma contração potente e sustentada em diferentes tecidos musculares lisos do pênis, como no CC, artéria cavernosa, veia dorsal profunda e veias circunflexas (Andersson e Wagner, 1995; Ritchie e Sullivan, 2011).

A ET-1 também modula o efeito contrátil de diferentes agonistas, como a NA (Mumtaz *et al.*, 2006). Este mecanismo deve-se em grande parte pela ação do

receptor ET_A, através do aumento da atividade da enzima RhoA (Wingard *et al.*, 2003). O papel dos receptores ET_B no CC ainda não está bem estabelecido, podendo induzir redução no tônus do CC mediado por NO (Ari *et al.*, 1996; Parkkisenniemi e Klinge, 1996). Este é um mecanismo regulatório, e é ativado para reduzir o efeito contrátil da ET-1 em situações patológicas, como na hipóxia, protegendo assim as estruturas do CC (Filippi *et al.*, 1999).

Diversos estudos mostram que o aumento de ET-1 possui um papel fisiopatológico em várias doenças e está frequentemente associado à DE (Ritchie e Sullivan, 2011), como na DM (Francavilla *et al.*, 1997), consumo de drogas de adição, como a cocaína (Kendirci *et al.*, 2007) ou na hipertensão arterial. A ET-1 está envolvida diretamente no prejuízo da função renal e no remodelamento cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos (Karam *et al.*, 1996).

O endotélio e as CMLCC são capazes de sintetizar a ET-1. Além disso, a expressão da ET-1 pode ser aumentada mediante ao estímulo por TGF-β1, IL-1β, a própria ET-1 e hipóxia prolongada (Granchi *et al.*, 2002).

Ambos os receptores para ET-1, ET_A e ET_B são expressos no CMLCC (Carneiro, Giachini*, et al.*, 2008). A ET-1 induz vasoconstrição no CC através de receptores ET_A e subsequente ativação de vias dependentes de Ca^{2+}, IP_3, e independentes de Ca^{2+}, Rho/RhoK, (Wingard *et al.*, 2003). Por outro lado, a ativação de receptores ET_B induz vasodilatação, aumentando a produção de NO em células endoteliais (Ari *et al.*, 1996).

Como já foi mencionado, a ET-1 mostra-se essencial na patogênese de algumas formas de hipertensão arterial. Além disso, camundongos com hipertensão mineralocorticoide apresentam resposta aumentada na reatividade no CC e aumento na expressão da ET-1 (Carneiro, Giachini*, et al.*, 2008). Esse aumento na pressão arterial e redução na função erétil deve-se a ET-1 estimular receptores ET_A (Carneiro, Nunes*, et al.*, 2008).

A ET-1 induz aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), principalmente por meio da ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato [*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* – NAD(P)H] oxidase via ET_A e, assim, reduz a biodisponibilidade de NO (Sanchez *et al.*, 2014). Ademais, ROS é produzido durante a hipertensão e também é capaz estimular a

produção de ET-1 (Hughes *et al.*, 1996), criando assim um ciclo que leva ao aumento na constrição do CC. Os receptores ET_B exercem função importante na patogênese da DE, pois contribui para o aumento na geração de ROS e disfunção endotelial em artérias penianas de ratos que apresentam resistência à insulina e obesidade (Sanchez *et al.*, 2014).

Destaca-se que a ET-1 estimula não somente a vasoconstrição no CC, como também na artéria pudenda interna, que é a principal artéria fornecedora de sangue para o CC (Allahdadi *et al.*, 2010). Também foi demonstrado que o CC, de ratos hipertensos DOCA/sal, possui resposta contrátil aumentada para ET-1 e para outros agonistas contráteis quando comparada com ratos normotensos (Carneiro, Giachini*, et al.*, 2008; Carneiro, Nunes*, et al.*, 2008).

O consumo abusivo de etanol aumenta a concentração plasmática e a potência da contração induzida pela ET-1, e também uma maior expressão de receptores ET_A no MLCC (Leite *et al.*, 2007). Este efeito pode ser devido ao aumento na produção de ânion superóxido (O_2^-), ROS e da catalase, além da redução da superóxido dismutase (SOD) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que estão envolvidos na patogênese da DE, seguida do consumo crônico de etanol (Muniz *et al.*, 2015).

1.3.6. Papel da ET-1 na modulação da inflamação crônica

Além da sua função típica como constritor, a ET-1 modula o processo inflamatório no leito vascular, através da ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear-κB (*nuclear factor-κB* – NF-κB) e a proteína ativadora-1 (*activator protein-1* – AP-1), e eleva os níveis de TNF-α, IL-1β e IL-6 (Yeager *et al.*, 2012). Estes fatores de transcrição e citocinas pró-inflamatórias, por sua vez, estimulam a produção de ET-1, isto cria um ciclo vicioso que leva ao aumento do processo inflamatório (Virdis e Schiffrin, 2003). A ET-1 exacerba a geração de ROS, que contribui para o processo inflamatório, em diferentes tipos de células, via ativação de NF-κB, ciclooxigenase (COX) e NAD(P)H oxidase (Piechota e Goraca, 2011; Donate *et al.*, 2012; Kleniewska *et al.*, 2013).

A ET-1 incrementa a síntese de TNF-α que estimula a quimiotaxia e fagocitose em macrófagos e neutrófilos (Bellisai *et al.*, 2011). Diversos estudos mostram que a ET-1 aumenta os níveis de TNF-α através de ET_A (Ozdemir *et al.*, 2006; Ford *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). O papel dos receptores ET_B ainda é controverso, pois o uso

de BQ788, antagonista de ET_B, reduz a expressão de TNF-α quando aplicado em pacientes com lesão no nervo óptico (Tonari *et al.*, 2012). Entretanto, Piechota-Polanczyk *et al.* (2012), não encontraram alterações nas concentrações de TNF-α, após a aplicação de BQ788, no coração de ratos.

A ET-1 aumenta a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (Li, Chu*, et al.*, 2003; Callera *et al.*, 2004), estimula a agregação de neutrófilos polimorfonucleares (NPM) e contribui para o aumento no processo inflamatório e disfunção endotelial. A ET-1 estimula a expressão da molécula de adesão à célula vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule-1* – VCAM-1) arterial em pacientes com hipertensão arterial (Li, Chu*, et al.*, 2003). A VCAM-1 e a molécula de adesão intercelular-1 (*intercelular adhesion molecule-1* – ICAM-1) são responsáveis pela adesão de células do sistema imune as células endoteliais no leito vascular (Blankenberg *et al.*, 2003).

Os NPMs promovem danos no miocárdio através do aumento na liberação de ROS, proteases e metabólitos do ácido araquidônico (Hansen, 1995). A ET-1 é responsável pelo acúmulo de NPMs, estresse oxidativo e disfunção na mucosa intestinal de ratos (Oktar *et al.*, 2000). O bloqueio de receptores ET_A reduz o número de neutrófilos e a atividade da mieloperoxidase no miocárdio isquêmico (Gonon *et al.*, 2001). Ademais, a deleção do gene que codifica a pré-pró-ET-1 em células endoteliais de camundongos reduz a inflamação vascular promovida pela ligação da artéria carótida (Anggrahini *et al.*, 2009).

O aumento na expressão de ET-1 está frequentemente ligado a modelos experimentais de aterosclerose, bem como na aterosclerose em humanos (Barton *et al.*, 2003), e seu nível está associado com a severidade da lesão aterosclerótica (Haug *et al.*, 1996) e elevação no infiltrado de macrófagos (Dashwood e Tsui, 2011). A hiper-expressão de ET-1 possui um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose e aneurisma de aorta abdominal, por meio da redução dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (*high-density lipoprotein* – HDL), aumenta ROS e também o infiltrado de monócitos e macrófagos (Li, Watts*, et al.*, 2003).

Diversos estudos apontam a ET-1 como responsável pelo aumento de marcadores inflamatórios presente na hipertensão arterial (Parissis *et al.*, 2002). Em contrapartida, observou-se significativo remodelamento, disfunção endotelial e

aumento da geração de ROS sem elevação da pressão arterial em camundongos transgênicos que hiper-expressam pré-pro-ET-1 humana (Amiri *et al.*, 2004).

Outros estudos mostraram que a ação da ET-1 no aumento da expressão de IL-18 está ligada a via da RhoA/RhoK (Naka *et al.*, 2008) e que o aumento de IL-18 causa deterioração da função cardíaca de forma parácrina e autócrina, induzindo hipertrofia, perda da contratilidade e apoptose dos cardiomiócitos (Doi *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que a ET-1 é capaz de ativar fagócitos, que liberam TNF-α, IL-1β e IL-6, além de aumentar a possibilidade da interação de células endoteliais vasculares e macrófagos (Helset *et al.*, 1993). Estudos prévios mostraram que a administração intracerebroventricular de ET-1 mimetiza o efeito intravenoso do lipopolissacarídeo (LPS) na indução da febre (Fabricio *et al.*, 1998). Posteriormente, observou-se que a ET-1 causa aumento significativo na produção de IL-1β na área pré-óptica, e este efeito parece estar relacionado à febre induzida por ET-1 (Fabricio *et al.*, 2006).

Muito é conhecido sobre o papel da ET-1 na modulação do processo inflamatório crônico. Entretanto, o seu papel na liberação de mediadores inflamatórios e recrutamento de células do sistema imune, bem como a via de sinalização envolvida ainda não estão muito bem esclarecidos. Um possível mecanismo, seria através do NLRP3, que tem a função de promover a ativação da caspase-1 e, com isso, a maturação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1β.

1.4. NLRP3

1.4.1. Sistema imune

O sistema imunológico é constituído por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral. Este sistema é constituído por mecanismos inatos (imunidade inata) e adaptativos (imunidade adaptativa). A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio, sendo a primeira linha de defesa do organismo. Seus mecanismos compreendem barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis. A primeira defesa do organismo frente a um dano tecidual envolve diversas etapas intimamente integradas e constituídas pelos diferentes componentes desse sistema (Cruvinel Wde *et al.*, 2010).

1.4.2. Receptores de reconhecimento de padrão

O sistema imune inato possui várias famílias de receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors* – PRR), tais como receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* - TLR), receptores do tipo RIG, receptores do tipo domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (*nucleotide binding and oligomerization domain – NOD*) (*NOD-like receptors* – NLR), entre outros, responsáveis por detectar tais agressões ao organismo (Trinchieri e Sher, 2007).

Os PRRs são responsáveis por reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns – PAMPs*) ou a dano (*damage-associated molecular patterns – DAMPs*). A ativação destes receptores induz respostas imunes que são essenciais para a defesa do hospedeiro e reparo tecidual. No entanto, quando a infecção ou dano tecidual é muito grande, a resposta inflamatória pode ser prejudicial para o hospedeiro. Os receptores NOD, contendo sequências com repetições ricas em leucina (*leucine-rich repeat* – LRR) são PRRs que iniciam respostas inflamatórias a uma grande variedade de estímulos. NLRs são encontrados intracelularmente e compartilham uma estrutura de domínio único, que consiste em um domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos chamado domínio NACHT, localizado entre um domínio N-terminal efetor e um domínio LRR C-terminal (Martinon *et al.*, 2009; Pedra *et al.*, 2009).

A família de NLRs, em humanos, é constituída por 22 membros que podem ser subdivididos pela denominação de seus domínios N-terminais, que incluem domínios recrutadores de caspase (*caspase recruitment domain* – CARD) e domínio de pirina (*pyrin domain* – PYD). Uma vez ativados, os membros da família dos NLRs, NLRP (NOD, LRR e contendo domínio pirina) 1, NLRP3, NLRC4 (NOD, LRR e contendo CARD) 4 e ausência de melanoma 2 (AIM2), são capazes de formar complexos multiprotéicos chamados inflamassomas. O inflamassoma serve como uma plataforma para ativação de uma protease de cisteína, a caspase-1. A caspase-1 cliva a pró-IL-1β, promovendo liberação de IL-1β madura (Shao *et al.*, 2007).

1.4.3. O inflamassoma

Existem diferentes PRRs que agem em conjunto, com a função de manter o organismo livre de agressões por DAMPs e PAMPs. Estes PRRs podem ser ligados a membrana, como os TLRs e receptores para lectina tipo C, ou intracelulares, como

os NLRs, que são especializados na detecção de DAMPs e PAMPs que atingem o citosol ou as organelas celulares.

Existem diversos membros da família dos NLR que estão envolvidos na formação da plataforma inflamassoma, estes ativam proteases baseadas em cisteínas, caspase-1, também conhecida como enzima conversora de IL-1β. A caspase-1 cliva a pró- IL-1β e a pró-IL-18, promovendo a maturação dessas citocinas e a consequente liberação para o meio extracelular (Mariathasan e Monack, 2007; Martinon *et al.*, 2009) **(figura 6)**.

A secreção de IL-1β está envolvida em diversas respostas do sistema imune, como a febre, aumento da migração de leucócitos para sítios de infecção, além de promover aumento da resposta do sistema imune adaptativo (Sims e Smith, 2010). A IL-18 promove a polarização de células T auxiliar [*helper* (Th)] 1 e 2, na presença de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-4 e IL-10 (Nakanishi *et al.*, 2001; Harrington *et al.*, 2005; Dinarello, 2009).

O complexo do inflamassoma é formado através dos NLR, que reconhecem direta ou indiretamente a presença de patógenos ou agressões ao meio intracelular através de sua porção C-terminal LRR, causando desdobramento e exibindo o seu domínio NOD, que se torna livre para oligomerizar-se. Isto faz com que seu domínio efetor N-terminal seja exposto e recrute a proteína acopladora do tipo espécie apoptótica contendo um domínio CARD (*apoptosis speck-like protein containing a CARD domain* – ASC), promovendo assim a ativação da caspase-1. Alternativamente, alguns membros da família do inflamassoma podem ligar-se diretamente na caspase-1 através de seu domínio CARD (Inohara *et al.*, 1999).

A ASC possui dois domínios: CARD e PYD. O domínio CARD acopla-se a pró-caspase-1 e o domínio PYD a proteínas formadoras do inflamassoma, como NLRP3 e NLRP1, o que levando a autoclivagem da pró-caspase-1 e formação de suas formas ativas, o tetrâmero caspase-1. Entretanto, existem outras vias compensatórias envolvidas na ativação da caspase-1, como a caspase-11 (também conhecida como caspase-4).

Outros membros da família do inflamassoma também promovem a maturação da caspase-1, como o NLRP-1 e o NLRC4, através de seu domínio CARD nas suas

porções carboxil e amino terminais, algumas vezes não necessitam o recrutamento da ASC por interagirem diretamente com a caspase-1 (Hsu *et al.*, 2008).

O NLRP3 é de longe o membro mais estudado da família dos inflamassomas, sendo ativado por uma ampla gama de sinais de origem patogênica, endógena e ambientais (Rathinam *et al.*, 2012). Três mecanismos distintos têm sido propostos para explicar a ativação do NLRP3, tais como o efluxo de K^+, a geração de ROS mitocondrial e a desestabilização fago-lisossômica após a digestão de grandes partículas de agonistas, tais como o urato monossódico (Jin e Flavell, 2010).

1.4.4. Mediadores envolvidos na ativação do NLRP3

A ativação do NLRP3 depende de 2 sinais, sendo o primeiro devido a ativação da via TLR/NF-κB, promovendo aumento na transcrição gênica de pró-IL-1β. O NF-κB é ativado através de diversos mediadores, como TNF-α e a própria IL-1β (Bauernfeind *et al.*, 2009).

O segundo sinal induz a oligomerização do NOD e reunião da plataforma inflamassoma. Existem diversos ativadores do NLRP3, que incluem estímulos biológicos e químicos ligados a PAMPs e DAMPs (Hoffman e Brydges, 2011), sendo 3 principais estímulos para sua ativação **(Figura 6)**.

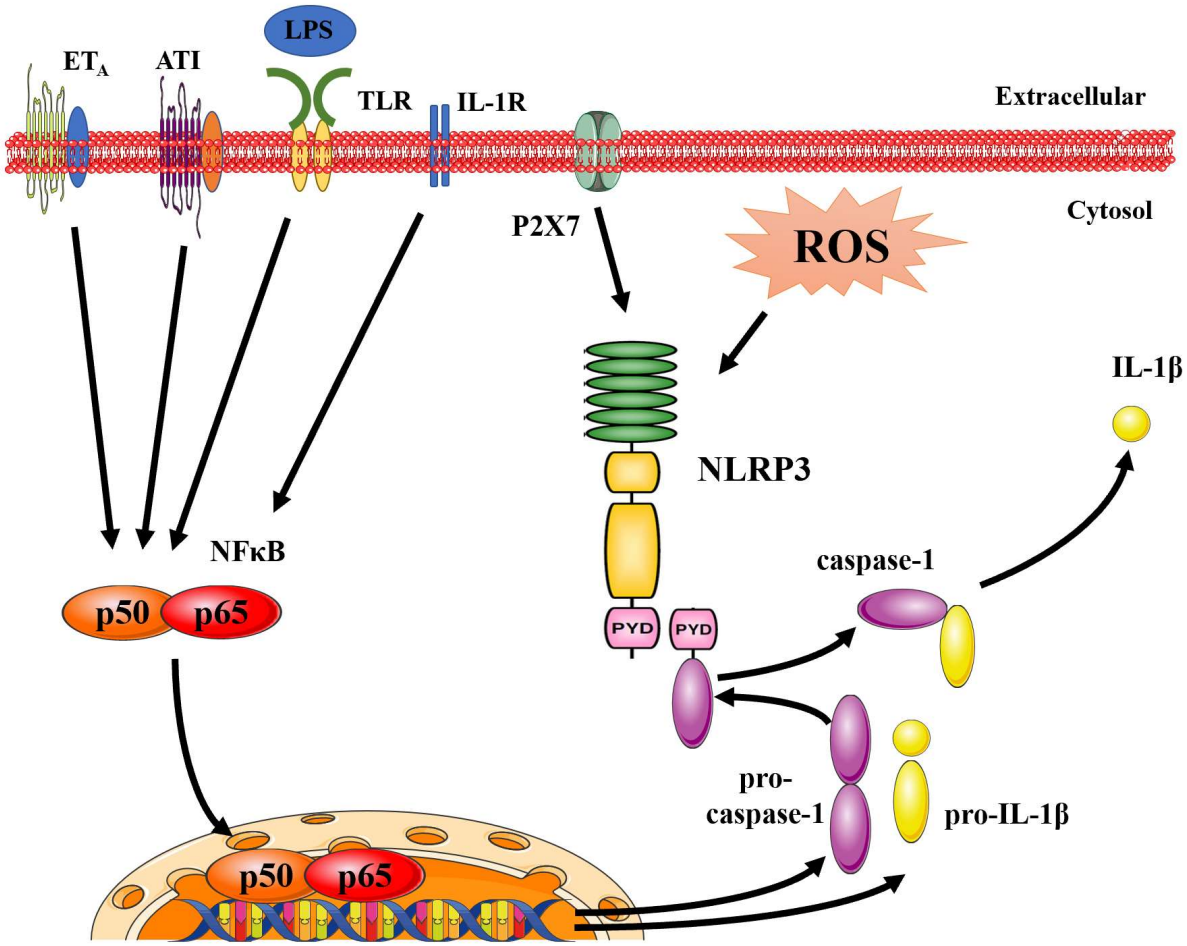


Figura 6. Sinalização e formação do complexo inflamassoma. Primeiro sinal para ativação do inflamassoma NLRP3 ocorre por meio da translocação do NF-κB para o núcleo e transcrição das formas inativas da caspase-1 e IL-1β. A transcrição do NF-κB podo ocorrer por meio da ativação de ET_A, ATI, TLR IL-1R. O segundo sinal, principalmente via aumento na geração de ROS ou ativação do canal purinérgico 7 (P2X7) levam a ativação do NLRP3, recrutamento da proteína acopladora ASC e da pró-caspase-1 e consequente liberação da caspase-1. A caspase-1 promove clivagem da pro-IL-1β e liberação de IL-1β.

O primeiro estímulo envolve o ATP extracelular, que é conhecido como o maior sinal liberado dos sítios de dano celular e necrose, sendo assim um importante ativador do NLRP3. Seu mecanismo depende, fundamentalmente, da ativação de canais iônicos sensíveis ao ATP, como o receptor purinérgico P2X7, responsável pelo efluxo de K^+ através da membrana celular (Petrilli *et al.*, 2007).

O aumento na geração de ROS, por meio da NAD(P)H oxidase ou disfunção mitocondrial também tem um grande papel na ativação do NLRP3. Isto ocorre principalmente devido ROS promover a ligação da proteína que interage com tioredoxina (*thioredoxin-interacting protein* – TXNIP) ao NLRP3 (Abais *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017).

O englobamento de partículas, como cristais de urato ou amianto, pode levar a desestabilização fago-lisossômica, devido ao seu tamanho ser muito grande para a translação citoplasmática, sendo um importante estímulo utilizado para ativação do NLRP3 (Hornung *et al.*, 2008).

1.4.5. Importância do NLRP3 no sistema cardiovascular

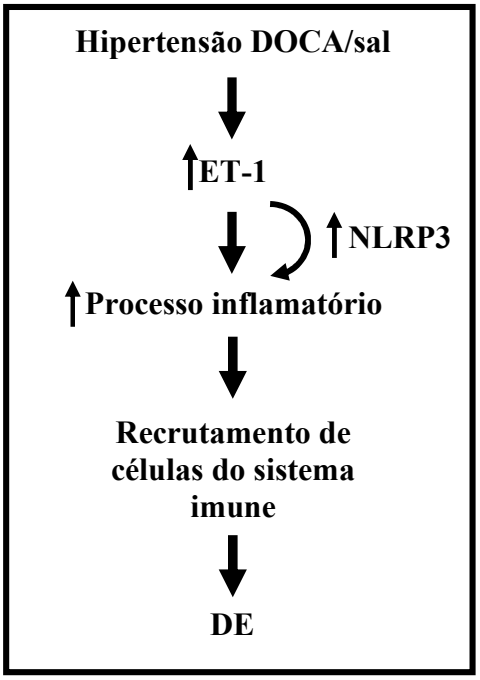
O processo inflamatório crônico causado pela ativação do NLRP3 está envolvido em diversas DCV, como aterosclerose (Yin *et al.*, 2013), insuficiência cardíaca (Kawaguchi *et al.*, 2011) e doença renal crônica (Vilaysane *et al.*, 2010; Komada *et al.*, 2014). Ademais, recentemente foi relatado que o NLRP3 possui um papel crucial no controle do tônus do CC em camundongos (Fais *et al.*, 2019).

Sua importância no sistema cardiovascular se dá, devido ao reconhecimento de DAMPs ou PAMPs por células endoteliais, CMLV e cardiomiócitos, promovendo assim produção de citocinas, quimiocinas e hormônios dilatadores (Foldes *et al.*, 2010), que facilitam a transferência e migração de leucócitos para o sítio da lesão (Tousoulis *et al.*, 2008). Além disso, as CMLV, via TLR e NLR, promovem aumento na atividade proliferativa e pró-inflamatória, e por esse mecanismo contribuem assim na gênese de desordens vasculares (Schultz *et al.*, 2007). Como mostrado em estudo recente, a expressão e liberação da IL-1β por células de músculo liso de aorta são mediadas pelo NLRP3 (Tangi *et al.*, 2012).

Considerando que os mecanismos periféricos responsáveis pela ereção são similares aos envolvidos no processo de regulação do tônus vascular, e que a DE compartilha dos mesmos fatores de risco que as doenças cardiovasculares (Shabsigh *et al.*, 2004), é possível que a ativação do NLRP3 esteja envolvida na gênese da DE.

2. Hipótese:

O NLRP3 medeia os efeitos pró-inflamatórios crônicos da ET-1 no CC de animais DOCA/sal, constituindo-se mecanismo importante para a gênese da DE.



3. Objetivo

Investigar o papel do NLRP3 na modulação do processo inflamatório induzido pela ET-1 no CC e na DE associada ao modelo de hipertensão DOCA/sal.

3.1. Objetivos específicos:

1) Confirmar se na hipertensão DOCA/sal ocorre aumento de ET-1, processo inflamatório no CC e DE. Para isto, a hipertensão DOCA/sal foi induzida em camundongos e foram avaliados os níveis de ET-1 e citocinas pró-inflamatórias, além da pressão intracavernosa.

2) Determinar se a ET-1 é responsável pelo aumento do processo inflamatório no CC e pela DE no modelo de hipertensão DOCA/sal. Para isto, camundongos com hipertensão DOCA/sal foram tratados com antagonista para receptores ET_A e ET_B (bosentan) ou veículo e avaliamos o aumento de citocinas pró-inflamatórias, expressão de moléculas de adesão, fatores de transcrição, infiltrado de células do sistema imune, além de análise da pressão intracavernosa.

3) Determinar se a ativação do NLRP3 na hipertensão DOCA/sal medeia o processo inflamatório no CC e a DE. Para isto, a hipertensão DOCA/sal foi induzida em

camundongos C57BL/6 (WT), deficientes para o receptor NLRP3 (NLRP3$^{-/-}$) e foram avaliados a reatividade no CC, os níveis de ET-1 e citocinas pró-inflamatórias, expressão de moléculas de adesão, fatores de transcrição, infiltrado de células do sistema imune, além de análise da pressão intracavernosa.

4) Determinar se a ET-1 é responsável pela ativação do NLRP3 e medeia o processo inflamatório no CC na hipertensão DOCA/sal. Para isto, camundongos WT com hipertensão DOCA/sal foram tratados com bosentan ou veículo e avaliamos a atividade do NLRP3.

5) Determinar se o infiltrado de células do sistema imune medeia o processo inflamatório no CC e a DE na hipertensão DOCA/sal. Para isto, a hipertensão DOCA/sal foi induzida em camundongos WT tratados com anticorpo anti-LY6G, deficientes para o RAG-1 (RAG-1$^{-/-}$) e foram avaliados a reatividade no CC, citocinas pró-inflamatórias e análise da pressão intracavernosa.

4. Materiais e métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos controle C57/BL6 (WT) provenientes do biotério de criação do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, camundongos deficientes para o receptor NLRP3 (NLRP3$^{-/-}$) e para RAG-1 (RAG-1$^{-/-}$) gerados a partir de camundongos WT, provenientes dos Biotérios dos Departamentos de Bioquímica e Imunologia e Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos. Esses animais foram alocados no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, mantidos em temperatura controlada (20 a 22°C), ciclos claro/escuro de 12 horas, 60% de umidade e alimentação com ração padrão e água *ad libitum*. Os camundongos foram utilizados na idade de 10 a 12 semanas (25 gramas). Todos os protocolos experimentais em animais foram submetidos para avaliação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 213/2016) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.2. Hipertensão DOCA/sal e medidas da pressão arterial.

A hipertensão DOCA/sal foi induzida como descrito anteriormente (Chitaley, Wingard*, et al.*, 2001). Os camundongos WT, NLRP3 ou RAG-1$^{-/-}$ foram anestesiados com isoflurano 3%, nefrectomizados unilateralmente e pellets silásticos de acetato de desoxicorticosterona (DOCA; 2,4 mg/dia) foram implantados na região escapular. Os camundongos DOCA receberam água contendo NaCl 1% e KCl 0,2%, por 3 semanas. Os camundongos controle também foram nefrectomizados unilateralmente, receberam pellets silásticos sem DOCA e água da torneira. Os camundongos controle ou DOCA/sal receberam bosentan [antagonista ET_A e ET_B (30 mg/Kg/dia por gavagem do dia 12 ao 21)], BE0075-1 [anticorpo anti-LY6G para depletar neutrófilos (200 µg nos dias 12 e 17 após a cirurgia) ou veículo. A pressão arterial sistólica foi medida nos camundongos, não-anestesiados, por pletismografia de cauda 3 dias antes da cirurgia para ambientação. Além disso, a pressão arterial sistólica também foi aferida no dia da cirurgia e nos dias 3, 7, 10, 14 e 21 após a cirurgia.

4.3. Medidas da pressão intracavernosa e pressão arterial média

Após 3 semanas de indução da hipertensão arterial DOCA/sal, os animais foram anestesiados com isoflurano 2%, a carótida esquerda e o CC direito do pênis de cada camundongo foram canulados para contínua monitorização da pressão

arterial média (PAM) e pressão intracavernosa (PIC), respectivamente. Para induzir as mudanças na PIC, o nervo cavernoso foi estimulado eletricamente com eletrodos de prata em diversas frequências (5 V, pulsos de 1 ms e frequências entre 0,2 a 20 Hz). Os valores obtidos pelas mudanças da PIC foram normalizados pela PAM.

4.4. Participação do NLRP3 no efeito agudo da ET-1 sobre a PIC/PAM

Após a cirurgia para realizar o procedimento de PIC/PAM, como descrito no parágrafo anterior, o nervo cavernoso foi estimulado a 16 Hz a fim de obter o efeito máximo (max) da PIC/PAM de cada animal. A seguir, utilizamos frequências entre 2 e 8 Hz para definir 50% do efeito máximo (submax). Uma vez definido o submax de cada animal, a ET-1 (0,2492 µg/Kg), MCC950 (0,42646 µg/Kg) ou veículo foram administrados através de injeção intracavernosa. Após a administração, o nervo cavernoso foi estimulado na frequência submax nos tempos de 3, 10, 20 e 30 minutos e na frequência max em 25 minutos. Aos 35 minutos foi realizada nova injeção de ET-1 ou veículo. Por último, novamente, o nervo cavernoso foi estimulado a frequência submax nos tempos de 38, 45, 55 e 65 minutos e na frequência max em 60 minutos. Os tempos para os estímulos e administrações de ET-1, MCC950 ou veículo estão representados na **Figura 7**.

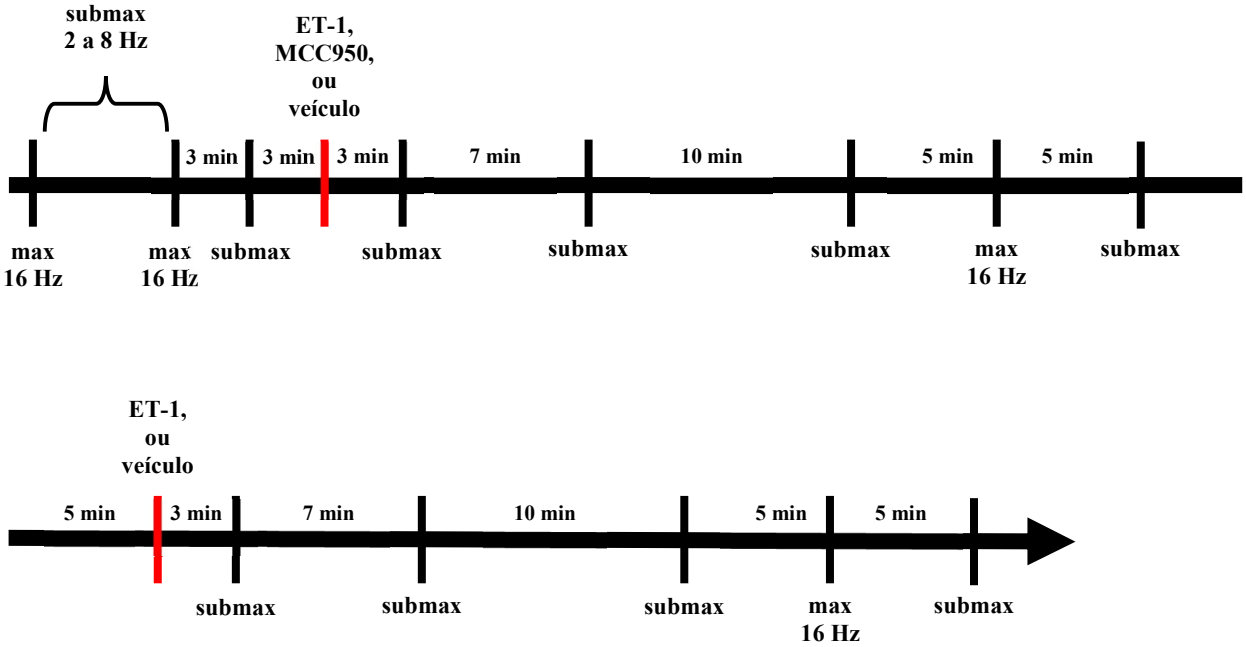


Figura 7. Tempos dos estímulos e administrações durante o experimento para demonstrar a participação aguda do NLRP3 no efeito da ET-1 sobre a PIC/PAM.

4.5. Estudo funcional nas tiras de CC

Os animais foram sacrificados em câmara de CO_2, os pênis foram extirpados e transferidos para solução refrigerada de Krebs-Henseleit (NaCl 130 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,18 mM, $MgSO_4.7H_2O$ 1,17 mM, $NaHCO_3$ 14,9 mM, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,026 mM, $CaCl_2.2H_2O$ 1,6 mM, e D-glicose 5,55 mM), e então dissecados como previamente descrito (Tostes *et al.*, 2007). As tiras foram montadas em câmaras de miógrafo com capacidade de 5 mL (Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca) contendo Krebs-Henseleit a 37 °C e continuamente aerado com uma mistura de 95% O_2 e 5% CO_2. Os tecidos foram então submetidos a tensão basal de 2,5 mN, a solução foi trocada e a tensão reajustada a cada 10 minutos, durante 60 minutos. Mudanças na tensão isométrica foram registradas usando um sistema de aquisição de dados PowerLab/8S (Labchart software, versão 7.0; ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA). A viabilidade da preparação foi testada por uma concentração única de fenilefrina (10^{-6} M). Após foi realizada uma curva concentração-resposta para fenilefrina (10^{-9}-10^{-4} M). As respostas relaxantes a acetilcolina (10^{-10}-10^{-5} M) e nitroprussiato de sódio (10^{-11}-10^{-5} M) também foram avaliadas. Além disso, também foram verificadas as respostas de relaxamento neurogênicos nas frequências entre 0,2 a 32 Hz (20 V, pulsos de 1 ms).

4.6. Western Blotting

4.6.1 Extração de Proteínas

Após extirpadas, as tiras de CC foram congeladas em nitrogênio líquido, e então pulverizadas. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de tampão de lise celular (Tris 0,05 mol/L, cloreto de sódio (NaCl) 0,150 mol/L, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,001 mol/L, Triton X-100 1%, Deoxicolato 1%, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1%, ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) 0,001 mol/L, fluoreto de sódio (NaF) $0,1X10^{-6}$ mol/L –e inibidor de proteases (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets –S8820 1X) 2 µL para cada 1 mL. As células foram então retiradas das placas de Petri mecanicamente. Em seguida, as células foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL, submetidas a homogeneização por rotação durante 30 minutos. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado na velocidade de 13.600 rpm a 4°C durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e acondicionado em novos tubos plásticos de 1,5 mL na temperatura de -80°C.

4.6.2 Dosagem de Proteínas:

Para determinação da concentração protéica nas amostras, foi utilizado o protocolo de Lowry. A cada experimento foi construída uma curva-padrão com solução de albumina nas concentrações de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,50; 1,0 e 2,0 mg/mL. Para tanto, a cada 100 µL do reagente de Lowry, foram adicionados 10 µL de cada amostra ou ponto da curva. Quando necessário, a amostra foi diluída 1:15 ou 1:20. O branco foi determinado pela leitura de 10 µL de água em 100µL do reagente de Lowry. A absorbância foi lida a 562 nm para a determinação proteica. Foram subtraídos os valores de absorbância do branco de cada amostra e o resultado foi aplicado à uma regressão linear das concentrações de BSA, de 2 mg/ml – 0.03125 mg/mL, reta da curva-padrão. O resultado foi expresso em mg de proteína/mL.

4.6.3 Eletroforese e transferência para membrana de nitrocelulose

Após a determinação da concentração de proteínas pelo método de Lowry (descrito anteriormente), as mesmas (50 ou 100 µg de proteínas) foram separadas por eletroforese, por duas horas, a 100 V, temperatura de 4° C, em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) e transferidas, por uma hora, para membrana de nitrocelulose a 100 V e temperatura de 4° C. Para comprovar a eficiência da transferência, os géis foram corados com azul de Coomassie e as membranas com vermelho de Ponceau 2%. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados com solução BSA 5% por uma hora em temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados (descritos na Tabela 1) foram incubados por 12 horas em temperatura de 4°C, enquanto os anticorpos secundários foram incubados por uma hora em temperatura ambiente. A visualização das bandas foi obtida após a reação com ECL (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) e a captura da imagem realizada em fotodocumentador Imagequant 350 (GE Healthcare, Piscata Way, NJ, EUA). Logo após, as membranas foram deblotadas com Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo) por 45 minutos a 37° C para serem reutilizadas. A análise densitométrica foi realizada pelo programa ImageJ®.

Tabela 1. Anticorpos utilizados

Anticorpo	Empresa	Catálogo	Diluição
Anticorpo Monoclonal de anti-Caspase-1 de camundongo	Imgenex	IMG-5028	1:500
Anticorpo policlonal anti-IL-1β (H-153) de coelho	Santa Cruz	SC-7884	1:500
Anticorpo monoclonal anti-α/β tubulina de coelho	Cell Signaling	2148S	1:5000

4.7. Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA)

O CC dos animais foi coletado e homogeneizado para a quantificação de IL-1β, TNF-α e IL-6. Além disso, o soro destes animais foi coletado para dosagem de ET-1. A determinação dos níveis destas citocinas foi realizada por método imunoenzimático (ELISA) utilizandos kits DuoSet ELISA Development Systems (R&D Systems) de acordo com as informações do fabricante. Resumidamente, as placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 µL/poço do anticorpo específico anti-IL-1β, anti-TNF-α, anti-IL-6 e anti-ET-1 (Tabela 2) na concentração descrita pelo fabricante. Esses anticorpos foram diluídos em PBS pH 7.4 e incubados overnight a 4 ºC. As placas foram lavadas por quatro vezes com PBS/Tween-20 (0,05 % Sigma). As ligações não-específicas foram bloqueadas com 100 µL de PBS contendo BSA 1% durante 1 hora a 37 ºC. As curvas-padrão iniciaram-se com concentrações conhecidas de IL-1β, IL-6, TNF-α e ET-1 que foram colocadas nas placas (50 µL) e incubadas overnight 4 ºC. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/T e 50 µL dos anticorpos biotinilados específicos para cada citocina foram adicionados nas concentrações descritas pelo fabricante. Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/T e o conjugado estreptavidina-peroxidase, na diluição de 1:200 foi adicionado a cada poço e incubados por 45 min. Novamente as placas foram lavadas com PBS/T e foi adicionado o substrato TMB (KPL, USA). A densidade óptica foi medida a 630 nm no espectrofotômetro SpectraMAX 190 Microplate Reader (Molecular Devices) e os dados foram analisados usando o software SoftMax Pro 5. A concentração de

citocinas contidas nas amostras foi calculada a partir de uma curva-padrão com 10 pontos obtidos por diluição seriada. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Tabela 2. Kits utilizados para quantificação dos níveis de citocinas, CCL2 no CC e ET-1 no soro de camundongos

Kit	Empresa	Catálogo
IL-6 DuoSet ELISA para camundongo	R&D System	DY406
TNF-α DuoSet ELISA para camundongo	R&D System	DY410
IL-1β/IL-1F2 DuoSet ELISA para camundongo	R&D System	DY401
CCL2/JE/MCP-1 Quantikine ELISA para camundongo	R&D System	MJE00B
Endotelina-1 Quantikine	R&D System	DET100

4.8. Imunofluorescência

Os CC foram obtidos e então mantidos em OCT, a -80°C. Os cortes transversais de CC de 5 mm de espessura foram obtidos em um micrótomo a -24ºC. Para confirmar a ativação do inflamassoma no CC dos camundongos, foi utilizado o kit de atividade da caspase-1 FLICA® 660. As sondas FLICA (1:10) e DAPI foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após isso, os cortes foram lavados, montados e visualizados por técnica de microscopia confocal. A intensidade da fluorescência foi definida em função da área. Para a definição da área do tecido foram utilizadas as imagens de microscopia de campo claro, DAPI e marcação com alfa-actina do músculo liso. Como controle adicional, foi utilizada a marcação com anticorpo anti-alfa-actina do músculo liso de camundongo (Abcam ab7817).

4.9. Imuno-histoquímica

Fatias de CC embebidas em parafina foram fixadas com paraformaldeído neutro 10%. Após desparafinização e reidratação em álcoois graduados, as seções

de tecido (5 µm) foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3% para eliminar a peroxidase endógena. A marcação para imuno-histoquímica foi realizada por um método de 3 etapas por streptavidina biotinilada [*labeled streptavidin biotin* (LSAB)]. As seções foram emblocadas por 30 minutos com soro de camundongo a temperatura ambiente e então, incubadas por 12 horas a 4 ºC com picrosírius ou anticorpo primário (Tabela 3). As seções foram lavadas com PBS (0,05 mol/L: pH 7,0 a 7,6) e então as seções marcadas com anticorpo primário foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado por 60 minutos. Após 3 lavagens em PBS, os antígenos foram visualizados com streptavidina conjugada a peroxidase e 3-amino-9-etil-carbasole como um cromogênio. Hematoxilina-eosina foi utilizada como um co-marcador. Os controles negativos foram expostos a soro de camundongo ou de coelho, diluído na mesma concentração do anticorpo primário. Os experimentos foram conduzidos com o mesmo tempo de incubação. As seções foram então observadas em microscópio de campo claro com um microscópio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokyo, Japan).

Tabela 3. Anticorpos utilizados para marcação de ICAM-1 e VCAM-1 no CC

Anticorpo	Empresa	Catálogo	Diluição
Anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 de coelho	Cell Signaling Technology	67836S	1:400
Anticorpo monoclonal anti-VCAM-1 de coelho	Cell Signaling Technology	39036S	1:500

4.9.1. Análise semi-quantitativa da expressão de VCAM-1, ICAM-1, picrosírius.

Um número positivo de células foi quantificado em cinco campos representativos do tecido. Foi utilizado um aumento de 400 vezes. Com este aumento, as células presentes em uma área de 10 mm x 10 mm foram quantificadas. As médias foram calculadas para cada tecido de animais WT ou NLRP3$^{-/-}$ uninefrectomizados ou DOCA/sal, tratados com bosentan ou veículo.

4.10. Citometria de fluxo e análise

Os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO_2). Os CC foram isolados e lavados em solução salina com tampão fosfato (*phosphate buffered*

saline, PBS), contendo cloreto de sódio 0,125 mol/L, cloreto de potássio 0,005 mol/L, fosfato de sódio monobásico 0,008 mol/L e fosfato de sódio dibásico 0,002 mol/L. Em seguida, foi realizada em ambiente estéril, a trituração mecânica do tecido, e o mesmo foi incubado em 20 mL de meio PBS contendo 20 mg de colagenase (Worthington BR N° 4196), 13 mg de DNAse (Sigma, D4263-1VL) por 30 minutos, a 37°C, para digestão. As células passaram por um filtro celular de 70 µM, a fim de remover qualquer sobra de tecido não digerido.

Para medir as citocinas intracelulares, as células provenientes do CC (1×10^6) em tubos para FACS (100 µL) foram estimuladas com acetato miristato de forbol [Phorbol 12-Myristate 13 acetate - PMA (50 ng/mL, Sigma)] e ionomicina (1 µM, Sigma) por 4 horas. As células do CC foram então incubadas com os anticorpos primários por 1 horas. Também utilizamos marcadores de superfície celular nas células provenientes do CC.

Como controle foram utilizadas células livres de marcação, além de células incubadas com um único anticorpo.

As marcações foram realizadas em duas etapas distintas, a primeira para diferenciar as populações positivas ou negativas para CD45, CD11b, CD4, F4/80 e LY6G. A segunda etapa para diferenciar as células positivas ou negativas para CD45, CD4, interferon gama e IL-17 (**Tabela 4**).

Após a lavagem para remover a marcação inespecífica, os pellets celulares foram ressuspendidos em 100 µL de PBS gelado. Em seguida, as amostras foram introduzidas e analisadas pelo citômetro de fluxo FACSAria III (Becton Dickinson). A análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo versão X (TreeStar).

Tabela 4. Anticorpos utilizados para citometria de fluxo no CC

Anticorpo/comprimento de onda	Empresa	Catálogo	Diluição
Anticorpo monoclonal anti-CD45R/Pacific Blue de rato	Becton Dickinson	558108	10 µg/mL
Anticorpo monoclonal anti-CD11b/PE de rato	Becton Dickinson	553311	10 µg/mL
Anticorpo monoclonal anti-F4/80/FITC de rato	Thermo Fisher Scientific	11-4801-82	10 µg/mL
Anticorpo monoclonal anti-LY6G/Alexa Fluor® 700 de rato	Becton Dickinson	561236	10 µg/mL
Anticorpo monoclonal anti-CD4/APC de rato	Becton Dickinson	552051	10 µg/mL
Anticorpo monoclonal anti-CD4/FITC de rato	Becton Dickinson	553046	10 µg/mL
Anticorpo monoclonal anti-IL17/PE de rato	Becton Dickinson	562542	10 µg/mL
Anticorpo monoclonal anti-IFN-γ de rato	Becton Dickinson	554413	10 µg/mL

4.10. Análise estatística:

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste t de Student ou pelo teste de análise de variância de uma via (ANOVA de uma via), seguido do pós-teste de Dunnet de acordo com cada análise. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. As respostas contráteis foram representadas como a força desenvolvida a partir do tônus basal em millinewtons (mN) normalizadas pelo peso seco (g) de tiras individuais do CC em um determinado número de experimentos.

Por outro lado, as respostas de relaxamento foram expressas como a porcentagem de relaxamento em relação aos níveis de pré-contração induzidos pela fenilefrina. Curvas concentração-efeito foram submetidas à análise de regressão não-linear. A potência dos agonistas e a resposta máxima foram expressas como pEC_{50} (logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima) e Emax (efeito máximo produzido pelo agonista), respectivamente. Análises estatísticas dos valores de Emax e pEC_{50} foram realizadas usando-se a regressão não-linear seguida pelo teste F ou teste “t” de Student. A pressão arterial sistólica foi avaliada pela análise de medidas repetidas ANOVA de duas vias, seguida de pós teste de Bonferroni. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism (GraphPad Prism 6.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)

5. Resultados

5.1. A ET-1 aumenta a pressão arterial em camundongos com hipertensão DOCA/sal.

Os camundongos submetidos ao protocolo DOCA/sal tiveram aumento gradual da pressão arterial sistólica, atingindo um platô no 10º dia, o qual manteve-se assim até o 21º dia (**Figura 8**).

O tratamento com bosentan restabeleceu a pressão arterial aos níveis basais em camundongos com hipertensão DOCA/sal no terceiro dia de tratamento (**Figura 8**).

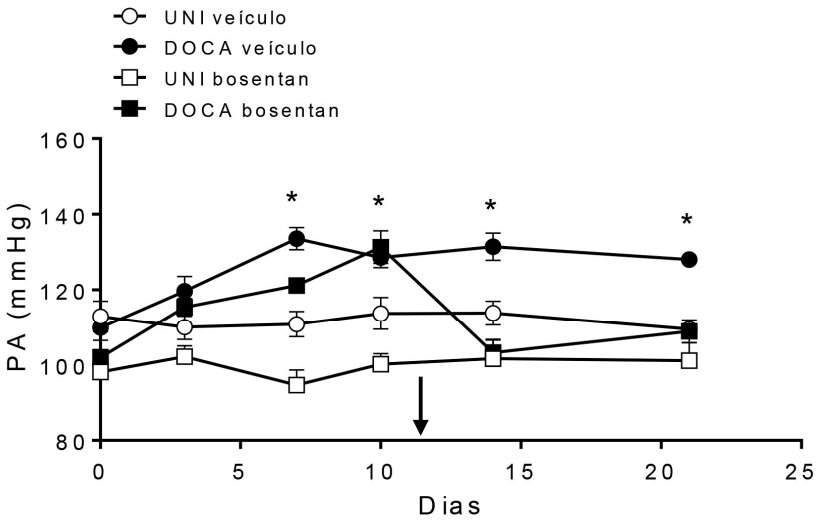


Figura 8. Análise temporal da pressão arterial sistólica, em camundongos WT submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou salina por 10 dias. A seta indica o início do tratamento com bosentan. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6-10.

5.2. A ET-1 aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da caspase-1 no CC de camundongos com hipertensão DOCA/sal.

A hipertensão DOCA/sal aumentou os níveis sistêmicos de ET-1 (**Figura 9A**) em camundongos. Além disso, houve aumento de IL-1β (**Figura 9B**) e TNF-α (**Figura 9C**) no CC de camundongos WT submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Contudo, os níveis de IL-6 não foram alterados (**Figura 9D**).

O tratamento com bosentan não reduziu os níveis sistêmicos de ET-1 em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal (**Figura 9A**). Entretanto, reduziu os níveis de IL-1β (**Figura 9B**) e de TNF-α (**Figura 9C**) no CC. Curiosamente, o bosentan reduziu os níveis basais de IL-6 no CC de camundongos WT, mas não em animais DOCA/sal (**Figura 9D**).

Uma vez demonstrado que a ET-1 induz o aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias no CC, decidimos investigar se o NLRP3 medeia estes efeitos.

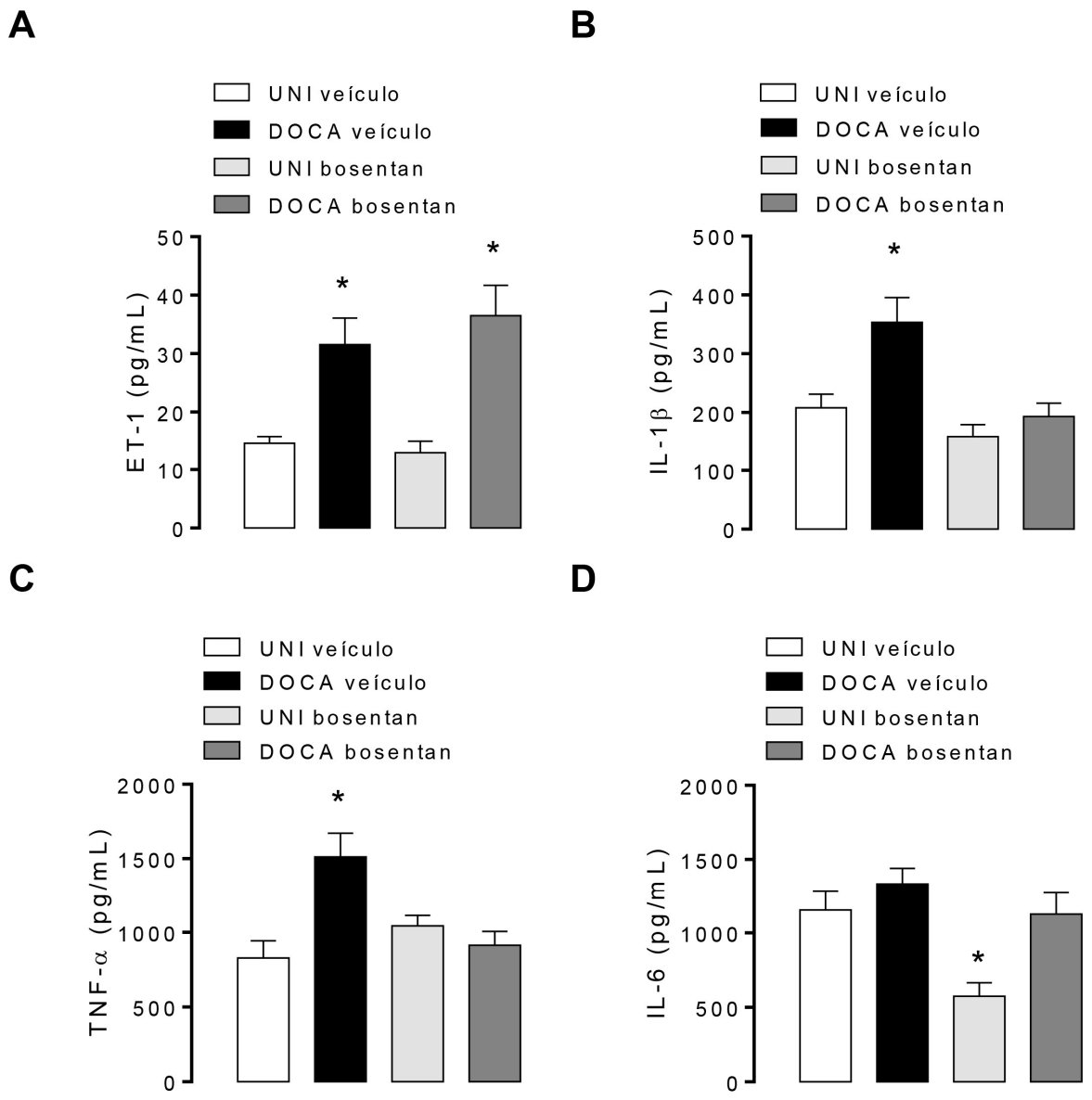
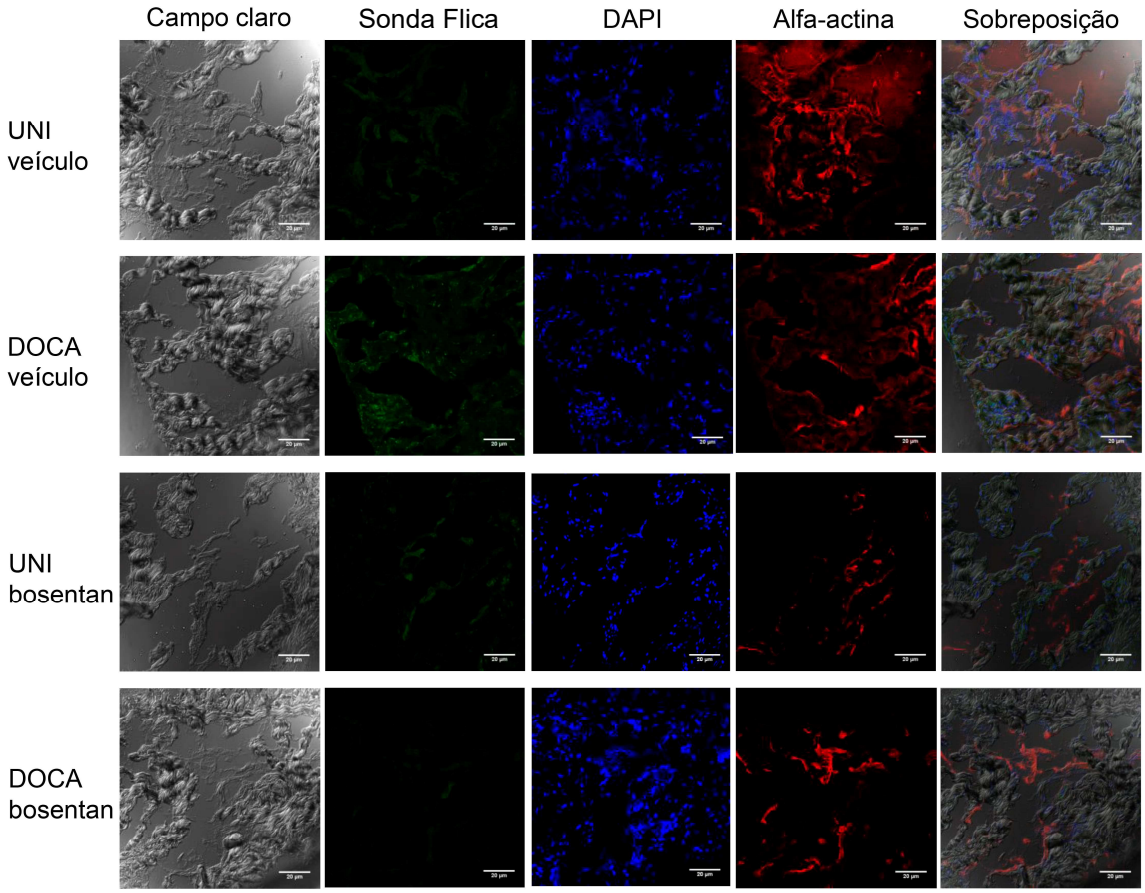


Figura 9. Análise dos níveis de ET-1 no soro (**A**) e de IL-1β (**B**), TNF-α (**C**) e IL-6 (**D**) no CC de camundongos WT submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, tratados por 10 dias com bosentan ou salina. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

Considerando que atividade da caspase-1 ocorre principalmente por meio da ativação do NLRP3, nós decidimos investigar a sua atividade.

De fato, a hipertensão DOCA/sal aumentou a atividade da caspase-1 no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. O tratamento com bosentan reduziu a atividade da caspase-1 aos níveis basais (**Figura 10**).



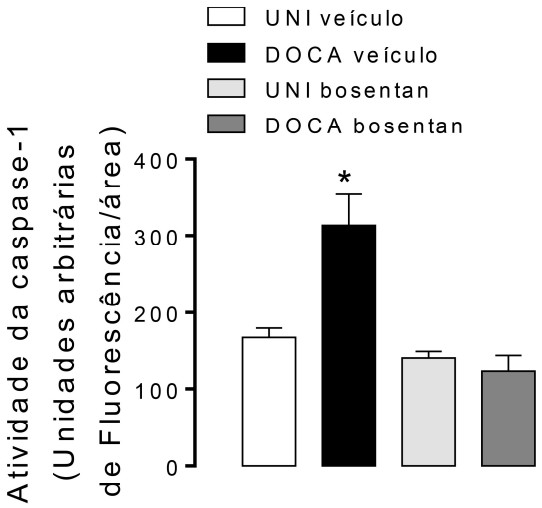


Figura 10. Análise da atividade da caspase-1 medida pela fluorescência para FAM FLICA no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, tratados 10 dias com bosentan ou salina. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=5.

O CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal apresentou aumento da expressão da IL-1β (**Figura 11A**) e caspase-1 (**Figura 11C**). O tratamento com bosentan reduziu a expressão da IL-1β (**Figura 11A**) e da caspase-1 (**Figura 11C**) aos níveis basais. Entretanto, nenhuma alteração foi observada na expressão da pró-IL-1β (**Figura 11B**) ou pró-caspase-1 (**Figura 11D**).

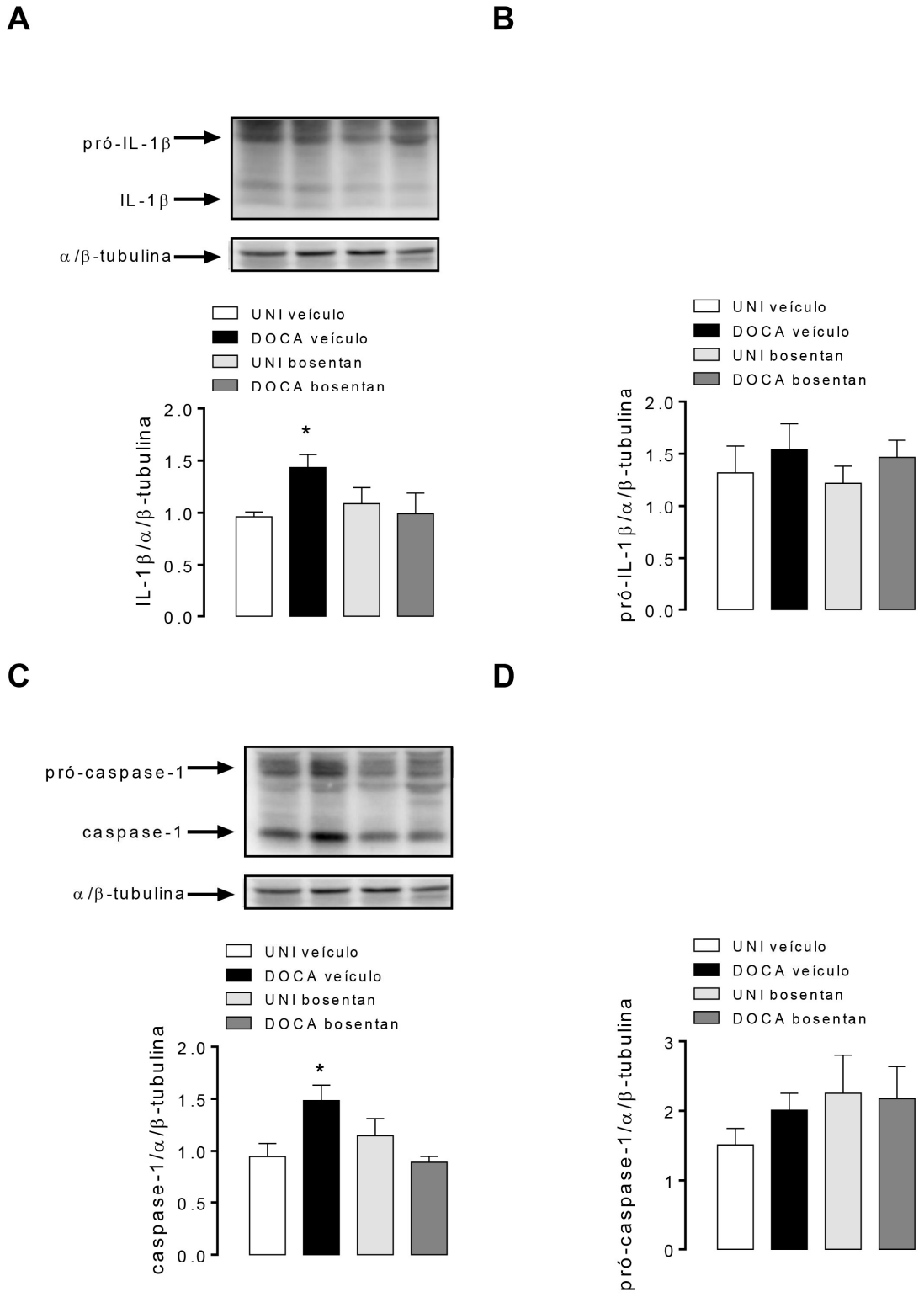


Figura 11. Análise densitométrica da expressão de IL-1β (**A**), pró-IL-1β (**B**), caspase-1 (**C**) e pró-caspase-1 (**D**) no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, tratados por 10 dias com bosentan ou salina. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

5.3. A ET-1 prejudica a função erétil em camundongos com hipertensão DOCA/sal.

A hipertensão DOCA/sal induziu o prejuízo na função erétil, a qual foi mensurada pela análise da pressão intracavernosa. Os camundongos DOCA/sal apresentaram prejuízo da função erétil nos estímulos entre as frequências de 4Hz e 20 Hz (**Figura 12**). O tratamento com bosentan restabeleceu a função erétil dos animais DOCA/sal aos níveis basais quando comparados com camundongos controle (**Figura 12**).

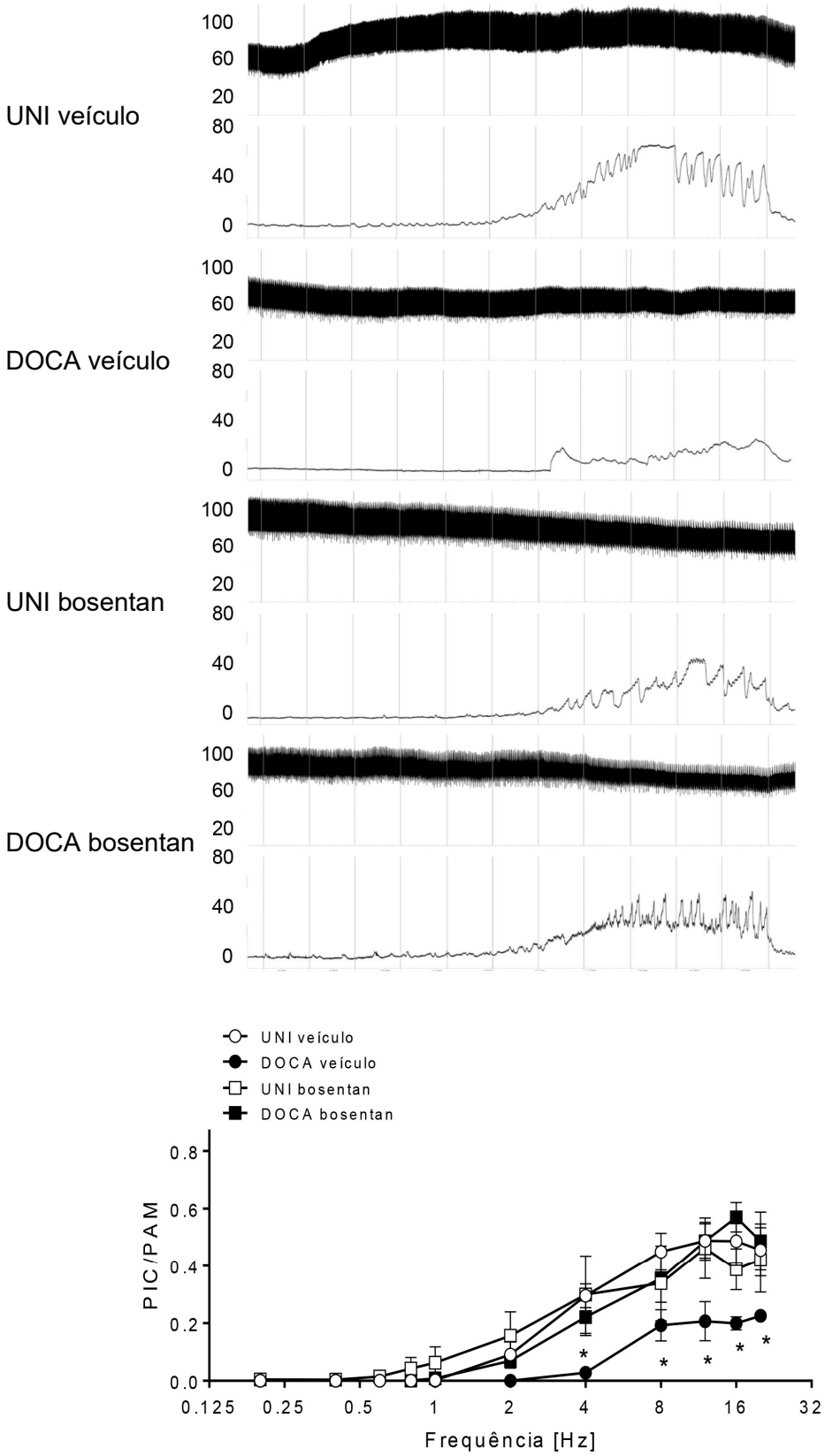


Figura 12. Traçado representativo da pressão arterial (topo) e da pressão intracavernosa (abaixo) de camundongos controle ou DOCA/sal, tratados com veículo ou bosentan. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05, comparado com o respectivo grupo controle. N=6-10.

5.4. O NLRP3 medeia o efeito agudo da ET-1 sobre a função erétil em camundongos.

Inicialmente, foi observado que os estímulos repetidos sobre o nervo cavernoso não produziram nenhum tipo de diminuição da resposta na PIC/PAM max e submax durante os 65 minutos de duração do protocolo (**Figura 13A**). A administração de veículo no CC dos animais não produziu qualquer mudança na PIC/PAM ao longo do protocolo experimental (**Figura 13A**). Entretanto, a administração intracavernosa de ET-1 (**Figura 13B**) reduziu a PIC/PAM submax nos tempos de 20 e 30 minutos quando comparada com a resposta no início do protocolo antes da administração da ET-1. É interessante observar que mesmo após a administração intracavernosa de veículo no tempo de 35 minutos, a PIC/PAM submax continuou reduzida, como pode ser observado nos tempos 45, 55 e 65 minutos (**Figura 13B**). A injeção intracavernosa de MCC950 induziu aumento da PIC/PAM somente no tempo de 3 minutos após a administração (**Figura 13C**). Além disso, a administração prévia de MCC950 foi capaz de abolir completamente a redução da PIC/PAM induzida pela ET-1 (a ET-1 foi administrada no tempo de 35 minutos do protocolo experimental **Figura 13C**).

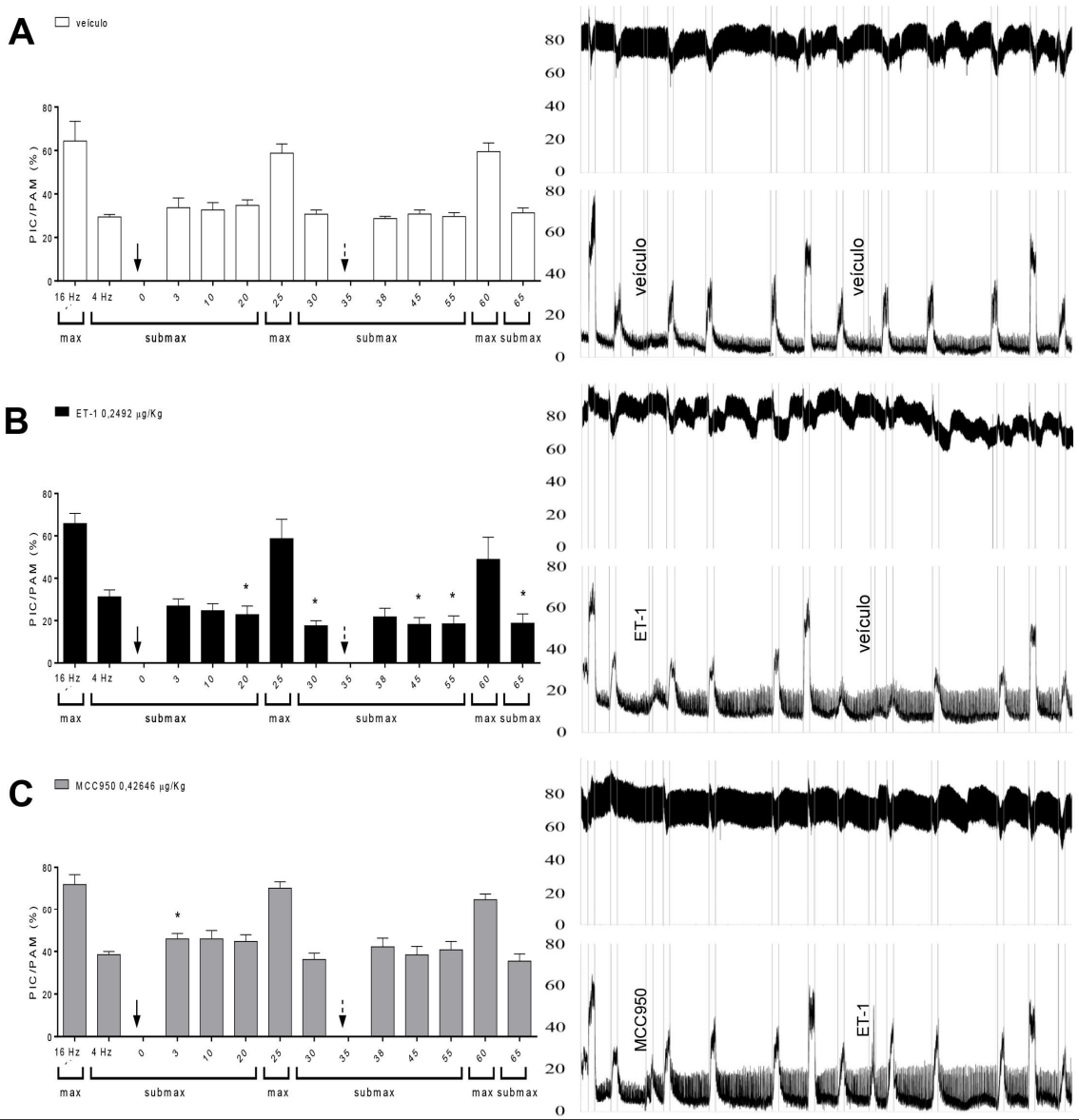


Figura 13. Traçado representativo da pressão arterial e da pressão intracavernosa de camundongos WT com a administração de veículo **(A)**, ET-1 **(B)** ou MCC950 **(C)**, seguida da administração de veículo ou ET-1 aos 35 minutos do protocolo experimental. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) frente a estímulo por max (16 Hz) ou submax (2 a 8 Hz). Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05, comparado com o respectivo grupo controle.

5.5. A ET-1 prejudica a reatividade do CC em camundongos com hipertensão DOCA/sal.

As curvas para contração induzida pela fenilefrina (**Figura 14A**) e o relaxamento mediado por estímulo elétrico (**Figura 14B**) em tiras de CC de camundongos DOCA/sal não apresentaram diferença quando comparadas com o respectivo controle. Entretanto, as tiras de CC de camundongos DOCA/sal

apresentaram diminuição no relaxamento para acetilcolina (**Figura 14C**) e para o nitroprussiato de sódio (**Figura 14D**).

O tratamento com bosentan reduziu a pEC_{50} da curva de contração induzida pela fenilefrina (**Figura 14A**) e restaurou o relaxamento para acetilcolina (**Figura 14C**) e nitroprussiato de sódio (**Figura 14D**) aos níveis basais no CC de camundongos DOCA/sal. Além disso, o tratamento com bosentan aumentou a pEC_{50} da curva de relaxamento por nitroprussiato de sódio no CC de camundongos controle (**Figura 14D**). Os valores referentes a Emax e pEC_{50} estão descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5. Valores de Emax (%) e pEC_{50} das curvas de concentração-efeito para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio no CC de camundongos controles ou DOCA/sal.

Efeito do tratamento com bosentan na reatividade do CC em camundongos controle e com hipertensão DOCA/sal				
Droga	UNI veículo	DOCA veículo	UNI bosentan	DOCA bosentan
fenilefrina				
pEC_{50}	5,85 ± 0,14	5,93 ± 0,12	5,97 ± 0,19	4,80 ± 0,19*
Emax	1145 ± 70,08	1295 ± 92,42	1209 ± 114,5	1020 ± 193,0
acetilcolina				
pEC_{50}	7.20 ± 0,08	6.55 ± 0,12*	7,05 ± 0,07	7.23 ± 0.09
Emax	95,02 ± 3,01	82,21 ± 4,96	96,54 ± 2,86	95,77 ± 3,45
nitroprussiato de sódio				
pEC_{50}	7,16 ± 0,07	6.36 ± 0,05*	7,90 ± 0,09*	7.60 ± 0,10
Emax	100	100	100	100

Valores são representados como média ± EPM (n=5-6 cada grupo). * $p<0.05$ UNI veículo vs DOCA veículo, UNI bosentan vs DOCA bosentan.

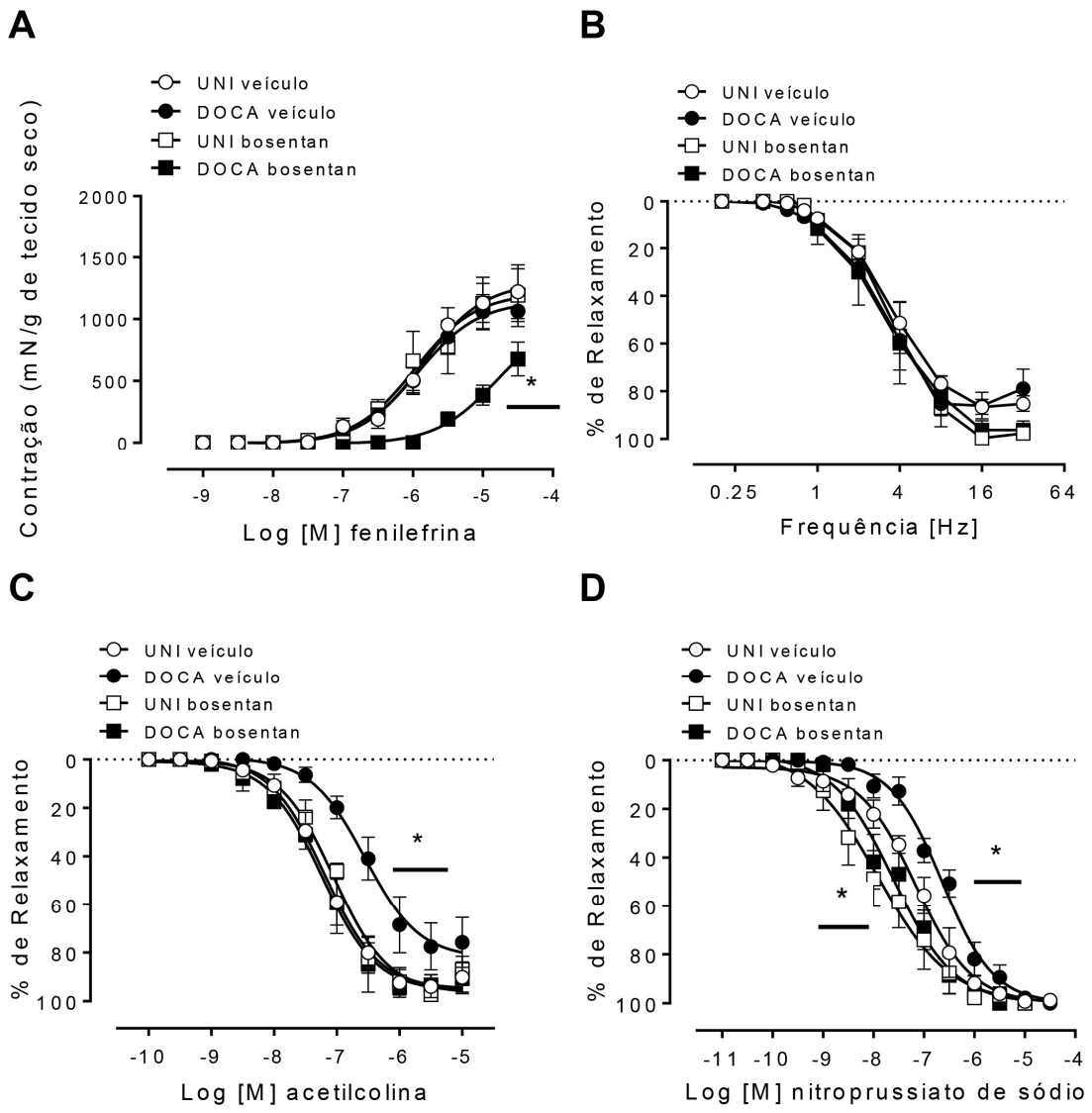


Figura 14. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (**A**), relaxamento mediado por estímulo elétrico (**B**), acetilcolina (**C**) e nitroprussiato de sódio (**D**) em tiras de CC de camundongos controle ou DOCA/sal, tratados com veículo ou bosentan. Dados expressos como média ± EPM. *, p<0,05 em relação grupo controle. N=6.

5.6. O aumento na pressão arterial de camundongos com hipertensão DOCA/sal depende do NLRP3.

A ausência do NLRP3 promoveu aumento da pressão arterial no terceiro dia nos camundongos DOCA/sal. Entretanto, a pressão arterial retornou aos níveis basais nos camundongos NLRP3$^{-/-}$ DOCA/sal no dia 7 após a cirurgia. A ausência do NLRP3 não alterou a pressão arterial nos camundongos controle. (**Figura 15**).

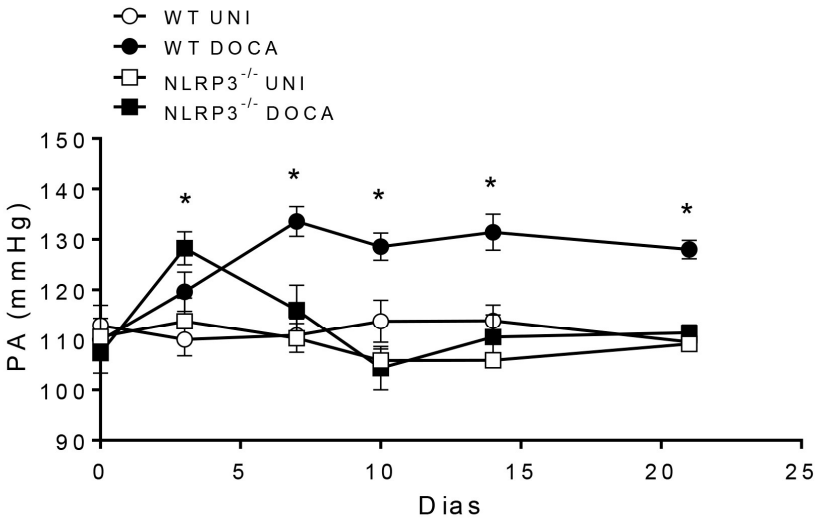


Figura 15. Análise temporal da pressão arterial sistólica, em camundongos WT e deficientes para o receptor NLRP3 (NLRP3$^{-/-}$) submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6-10.

5.7. O aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da caspase-1 em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende do NLRP3.

A ausência do NLRP3 não reduziu os níveis sistêmicos de ET-1 em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal (**Figura 16A**). Entretanto, normalizou os níveis de IL-1β (**Figura 16B**) e TNF-α (**Figura 16C**) no CC de animais DOCA/sal. Nenhuma alteração foi induzida nos níveis de IL-6 no CC dos animais hipertensos (**Figura 16D**).

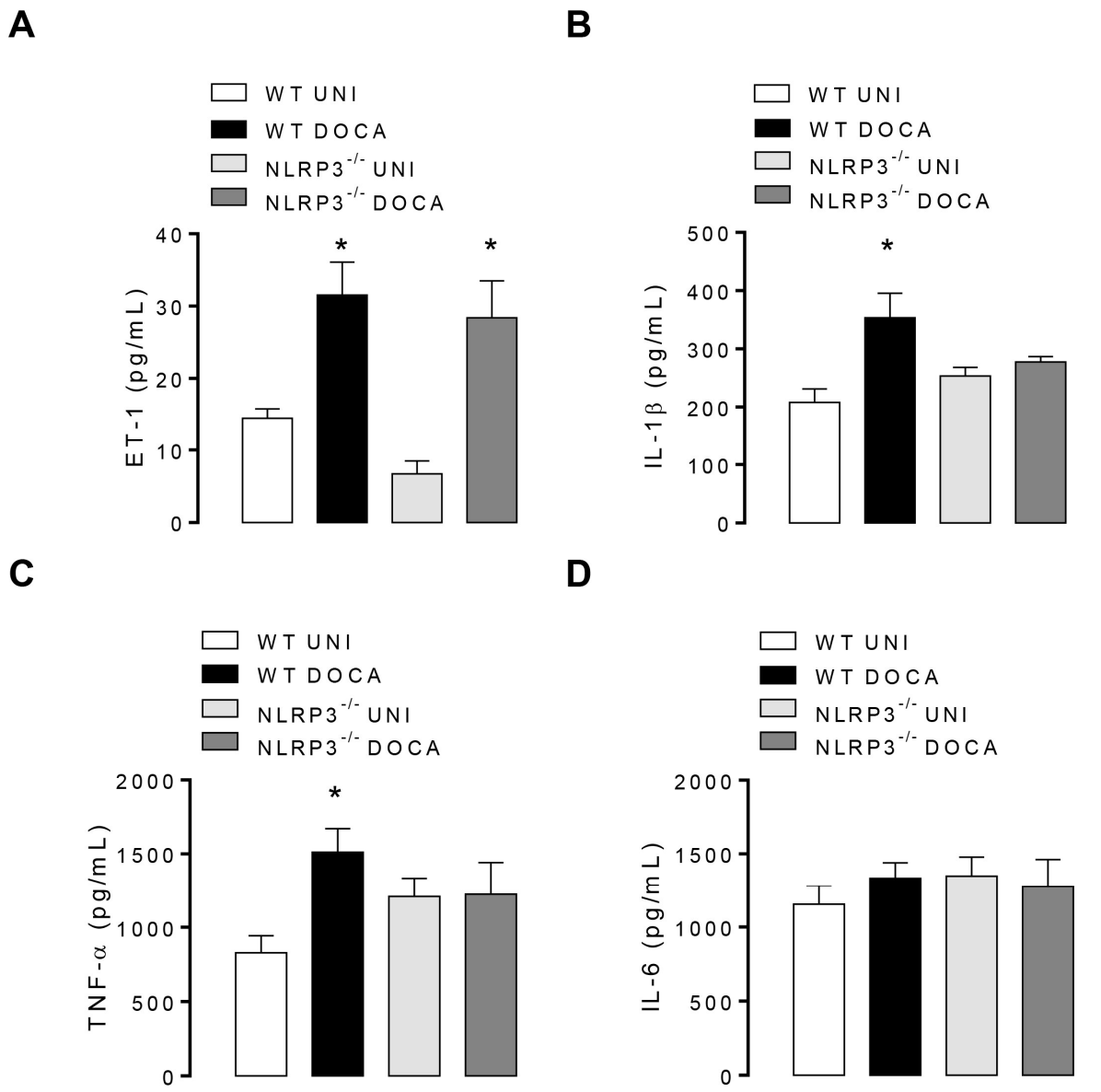
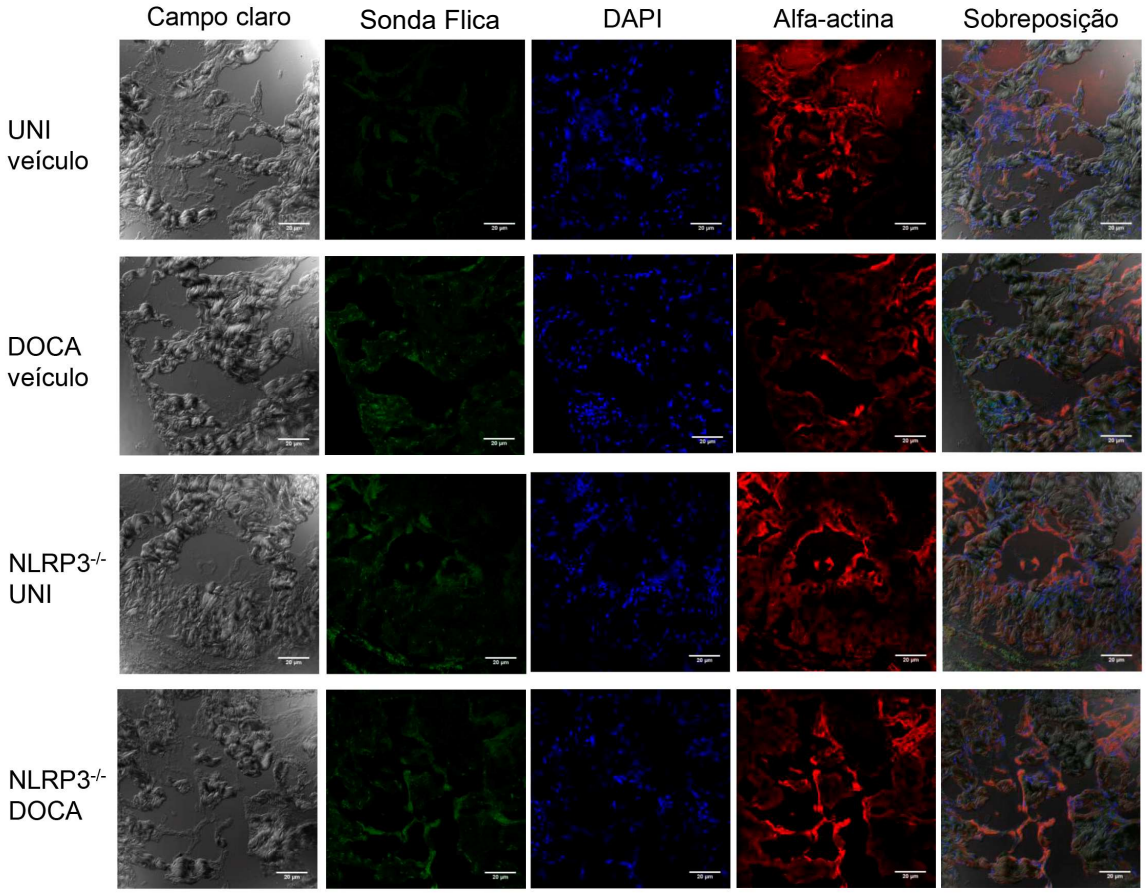


Figura 16. Análise dos níveis de ET-1 no soro (**A**) e de IL-1β (**B**), TNF-α (**C**) e IL-6 (**D**) no CC de camundongos WT e NLRP3$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

A hipertensão DOCA/sal aumentou a atividade do NLRP3, medida pela atividade da caspase-1, no CC de camundongos. A ausência do NLRP3 preveniu o aumento da atividade da caspase-1 induzida pela hipertensão DOCA/sal (**Figura 17**).



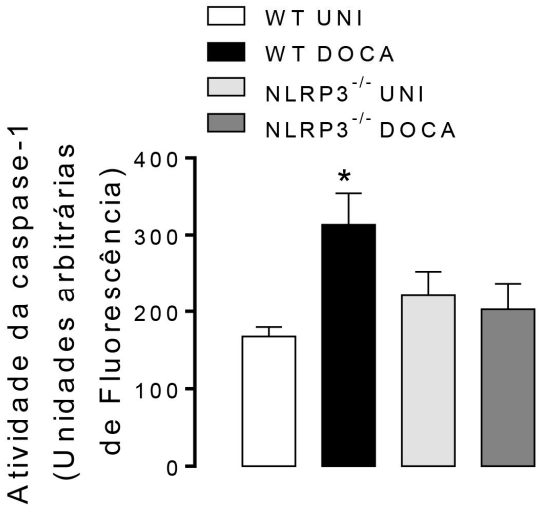


Figura 17. Análise da atividade da caspase-1 medida pela fluorescência para FAM FLICA em camundongos WT ou NLRP3$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=5.

A ausência do NLRP3 preveniu o aumento na expressão da IL-1β (**Figura 18A**) e da caspase-1 (**Figura 18C**) no CC de camundongos DOCA/sal. Entretanto, nenhuma alteração foi observada na expressão da pró-IL-1β (**Figura 18B**) ou pró-caspase-1 (**Figura 18D**).

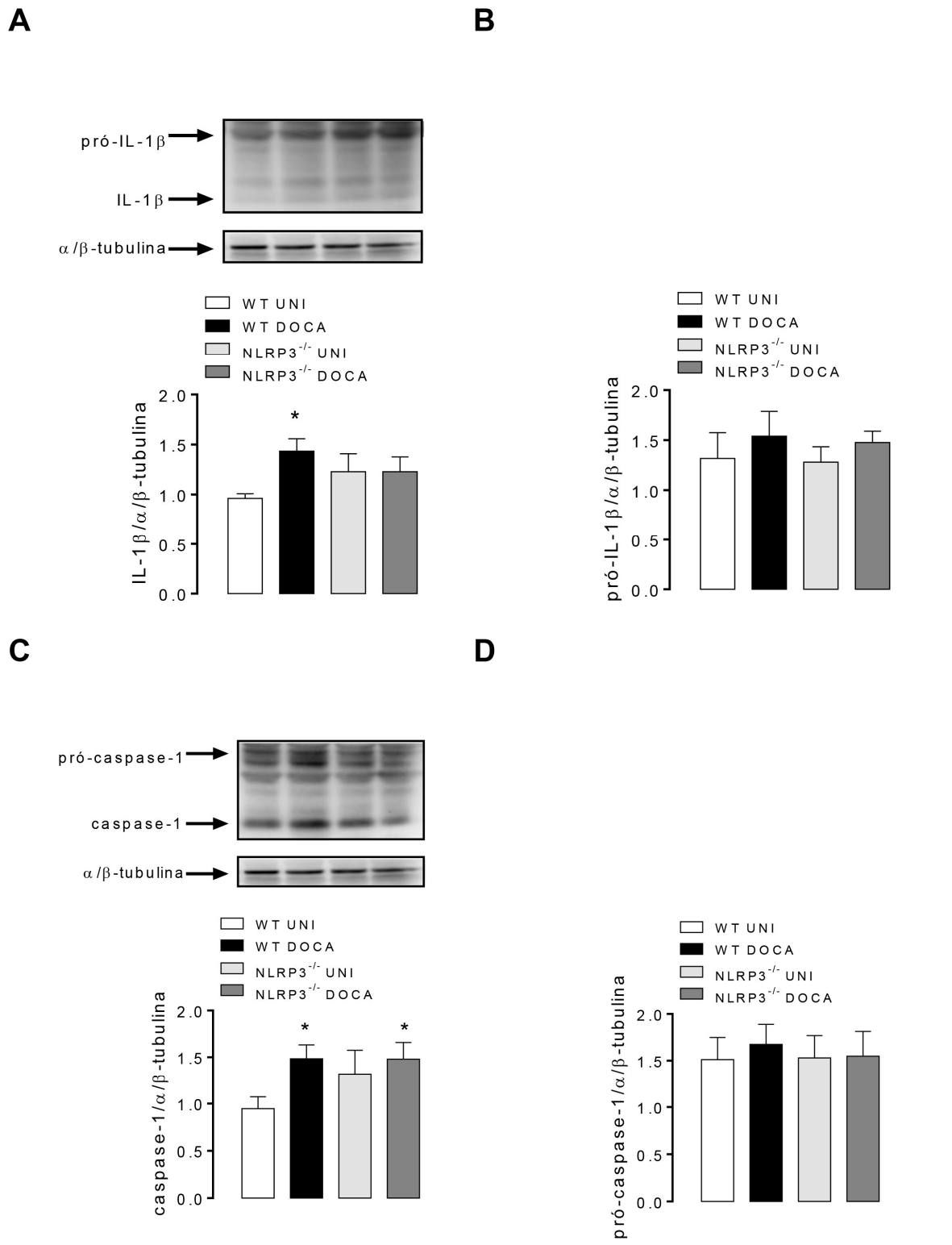


Figura 18. Análise densitométrica da IL-1β (**A**), pró-IL-1β (**B**), caspase-1 (**C**) e pró-caspase-1 (**D**) no CC de camundongos WT e NLRP3$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

5.8. O prejuízo na função erétil e na reatividade do CC em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da atividade do NLRP3.

A ausência do NLRP3 previne a redução na PIC/pam promovida pela hipertensão DOCA/sal em camundongos. Adicionalmente, não foi observada alteração na pressão arterial dos camundongos NLRP3$^{-/-}$ controle (**Figura 19**).

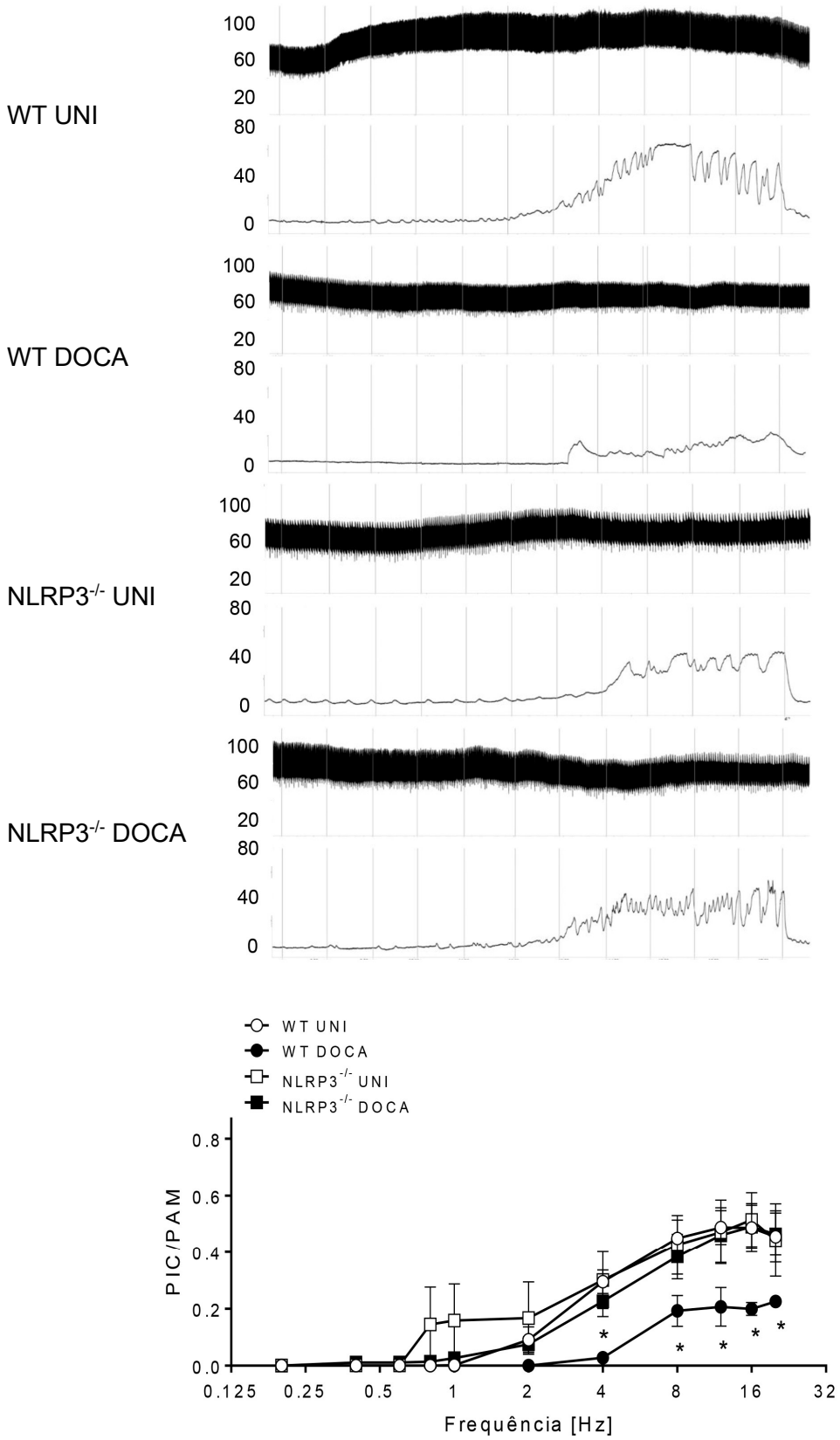


Figura 19. Traçado representativo da pressão arterial (topo) e da pressão intracavernosa (abaixo) de camundongos WT ou NLRP3$^{-/-}$ submetidos ao protocolo de hipertensão DOCA/sal. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) em camundongos WT ou NLRP3$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05, comparado com o respectivo grupo controle. N=6-10.

A ausência do NLRP3 não alterou a contração para fenilefrina (**Figura 20A**) ou relaxamento mediado por estímulo elétrico (**Figura 20 B**) no CC de camundongos DOCA/sal ou controle.

A ausência do NLRP3 preveniu o prejuízo no relaxamento para acetilcolina (**Figura 20C**) e nitroprussiato de sódio (**Figura 20D**) no CC de camundongos DOCA/sal. Além disso, a pEC_{50} foi aumentada para o relaxamento mediado por nitroprussiato no CC dos camundongos $NLRP3^{-/-}$ quando comparado com o CC WT para o relaxamento para nitroprussiato de sódio. Os valores referentes a Emax e pEC_{50} estão descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6. Valores de Emax (%) e pEC_{50} das curvas de concentração-efeito para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio no CC de camundongos WT ou $NLRP3^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal.

Efeito da ausência do NLRP3 na reatividade do CC de camundongos WT ou $NLRP3^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal				
Droga	WT UNI	WT DOCA	$NLRP3^{-/-}$ UNI	$NLRP3^{-/-}$ DOCA
fenilefrina				
pEC_{50}	5,85 ± 0,14	5,93 ± 0.12	6,05 ± 0,16	5,78 ± 0,12
Emax	1145 ± 70,08	1295 ± 92,42	875 ± 41,33	928,90 ± 60,11
acetilcolina				
pEC_{50}	7.20 ± 0,08	6.55 ± 0,12*	7,05 ± 0,14	6,91 ± 0,16
Emax	95,02 ± 3,01	82,21 ± 4,96	90,28 ± 5,05	80,69 ± 5,06
nitroprussiato de sódio				
pEC_{50}	7,16 ± 0,07	6.36 ± 0,05*	8,16 ± 0,24*	8,56 ± 0,31*
Emax	100	100	100	100

Valores são representados como média ± EPM (n=5-6 cada grupo). * $p<0.05$ WT UNI vs WT DOCA, $NLRP3^{-/-}$ UNI vs $NLRP3^{-/-}$ DOCA.

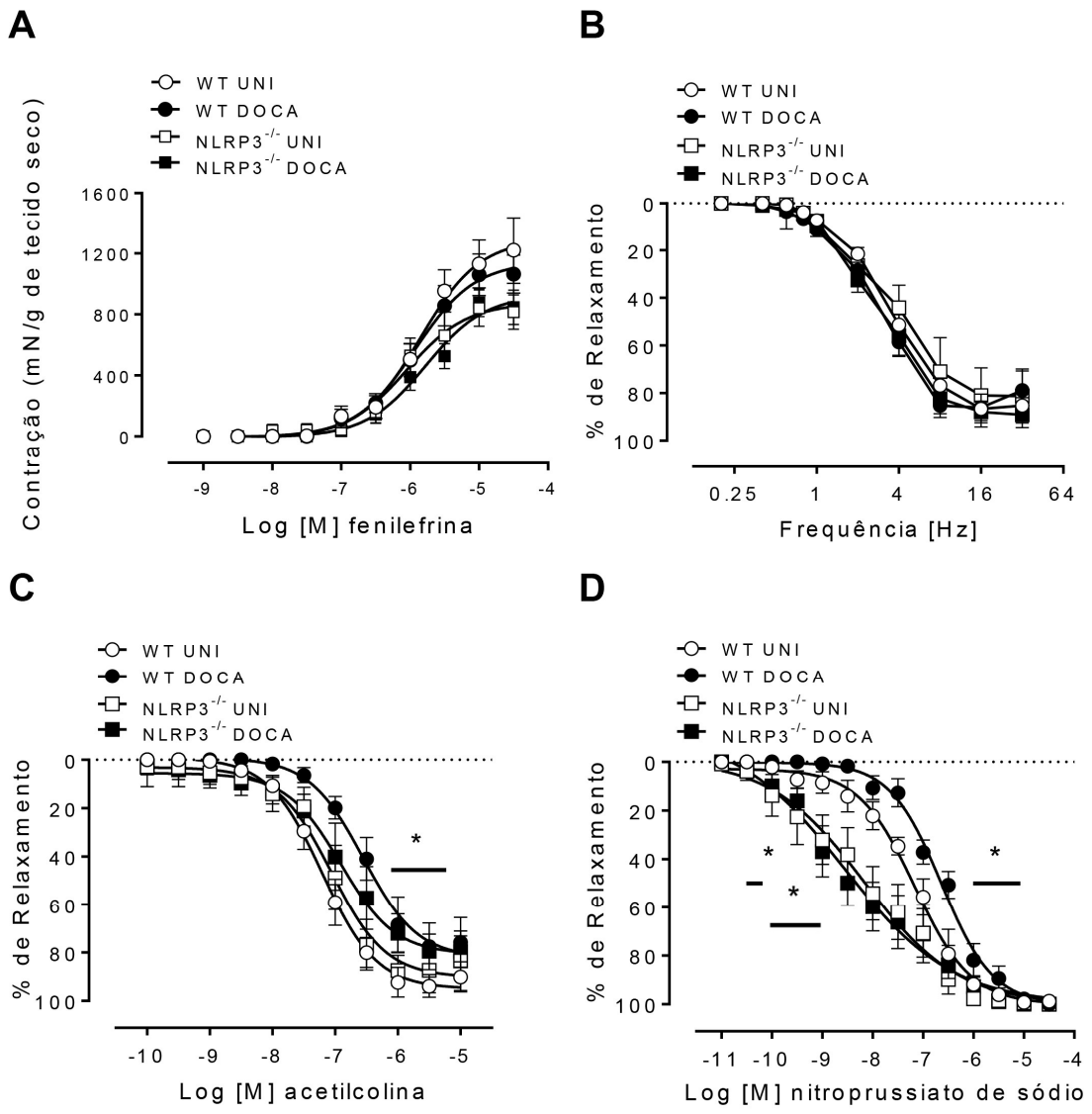


Figura 20. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (**A**), relaxamento mediado por estímulo elétrico (**B**), acetilcolina (**C**) e nitroprussiato de sódio (**D**) em tiras de CC de camundongos WT ou NLRP3$^{-/-}$ submetidos ao protocolo de hipertensão DOCA/sal. Dados expressos como média ± EPM. *, $p<0,05$ em relação grupo controle. N=6.

5.9. O NLRP3 medeia o recrutamento de neutrófilos e linfócitos Th1 induzido pela ET-1 no CC de camundongos hipertensos DOCA/sal.

A hipertensão DOCA/sal aumentou a porcentagem de células positivas para marcação com Ly6G (Neutrófilos) (**Figura 21A**) e para interferon-gama [IFN-γ (linfócitos Th1)] (**Figura 21C**) no CC. Não houve alteração significativa para marcação de células positivas para F4/80 (macrófagos) (**Figura 21B**) ou IL-17 (linfócitos Th17) (**Figura 21D**). As células mieloides (neutrófilos e macrófagos) também apresentaram marcação positiva para CD45 (leucócitos), CD11b (células mieloides) e negativa para CD4 (células linfoides) (**Figura 21A e B**). Adicionalmente, as células linfoides (linfócitos Th1 e Th17) apresentaram marcação positiva para CD45, CD4 e negativa para CD11b (**Figura 21C e D**).

O tratamento com bosentan ou a deleção do NLRP3, respectivamente, restaurou aos níveis normais ou preveniu o aumento neutrófilos (**Figura 21A**) e linfócitos Th1 (**Figura 21C**) no CC de animais submetidos a hipertensão DOCA/sal.

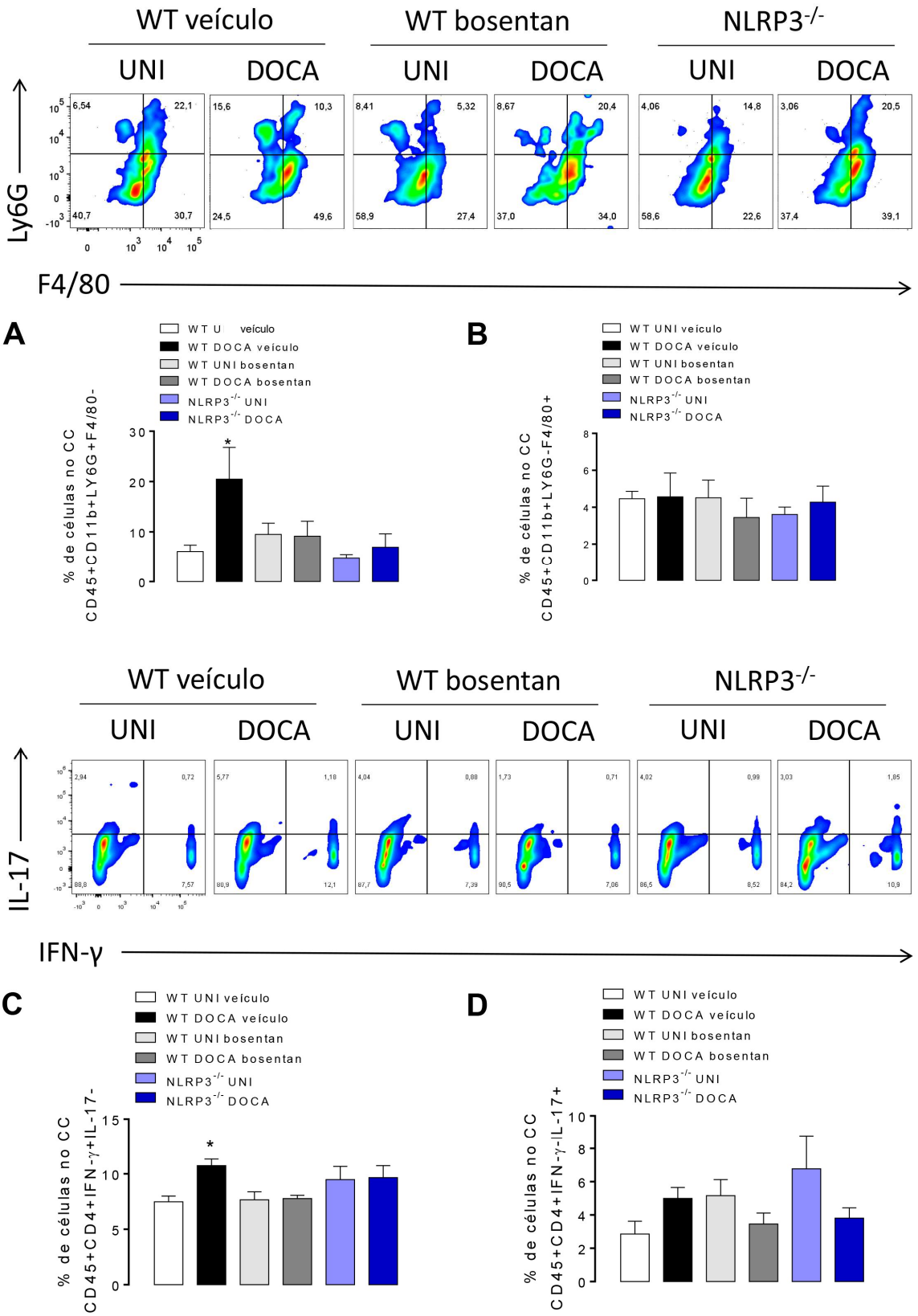


Figura 21. Porcentagem de células Ly6G+ (neutrófilos) (**A**), F4/80+ (macrófagos) (**B**), IFN-γ+ (linfócitos Th1) (**C**) e IL-17+ (linfócitos Th17) (**D**) em tiras do CC de camundongos WT submetidos a hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou veículo e animais NLRP3$^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal. Dados expressos como média ± EPM. *, p<0,05 em relação grupo controle. N=6.

Uma vez demonstrado que a ET-1 promove o aumento de neutrófilos e linfócitos Th1 no CC de camundongos DOCA/sal, e que isto depende da atividade do NLRP3, decidimos investigar os mecanismos envolvidos no recrutamento destas células do sistema imune para o CC.

5.10. O NLRP3 medeia o aumento na expressão de VCAM-1, ICAM-1 e CCL2 induzido pela ET-1 no CC de camundongos hipertensos DOCA/sal.

A hipertensão DOCA/sal aumentou os níveis de CCL2 no CC (**Figura 22**). O tratamento com bosentan ou a deleção do NLRP3, respectivamente, preveniu o aumento na liberação de CCL2 no CC de camundongos DOCA/sal.

A expressão de VCAM-1 aumentou no CC de camundongos DOCA/sal. Entretanto, o tratamento com bosentan foi capaz não apenas de prevenir o aumento de VCAM-1 no CC de animais DOCA/sal, mas reduziu a expressão no CC de camundongos controle e DOCA/sal quando comparados com os animais tratados com veículo (**Figura 23A**). A deleção genética do NLRP3 foi capaz apenas de prevenir o aumento na expressão de VCAM-1 no CC de camundongos DOCA/sal (**Figura 23A**).

A hipertensão DOCA/sal aumentou a expressão da ICAM-1 no CC (**Figura 23B**). O tratamento com bosentan ou a deleção do NLRP3, respectivamente, preveniu o aumento na expressão de ICAM-1 no CC de camundongos DOCA/sal.

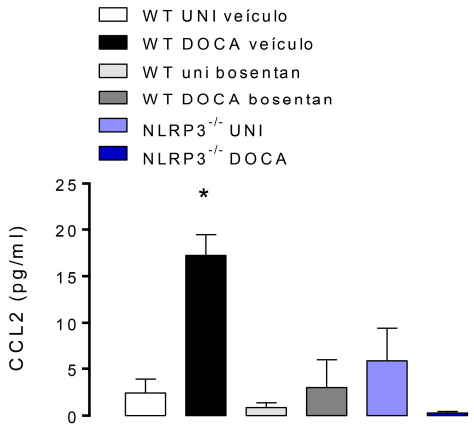


Figura 22. Análise dos níveis de CCL2 em tiras do CC de camundongos WT submetidos a hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou veículo e animais NLRP3$^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * $p<0,05$ comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

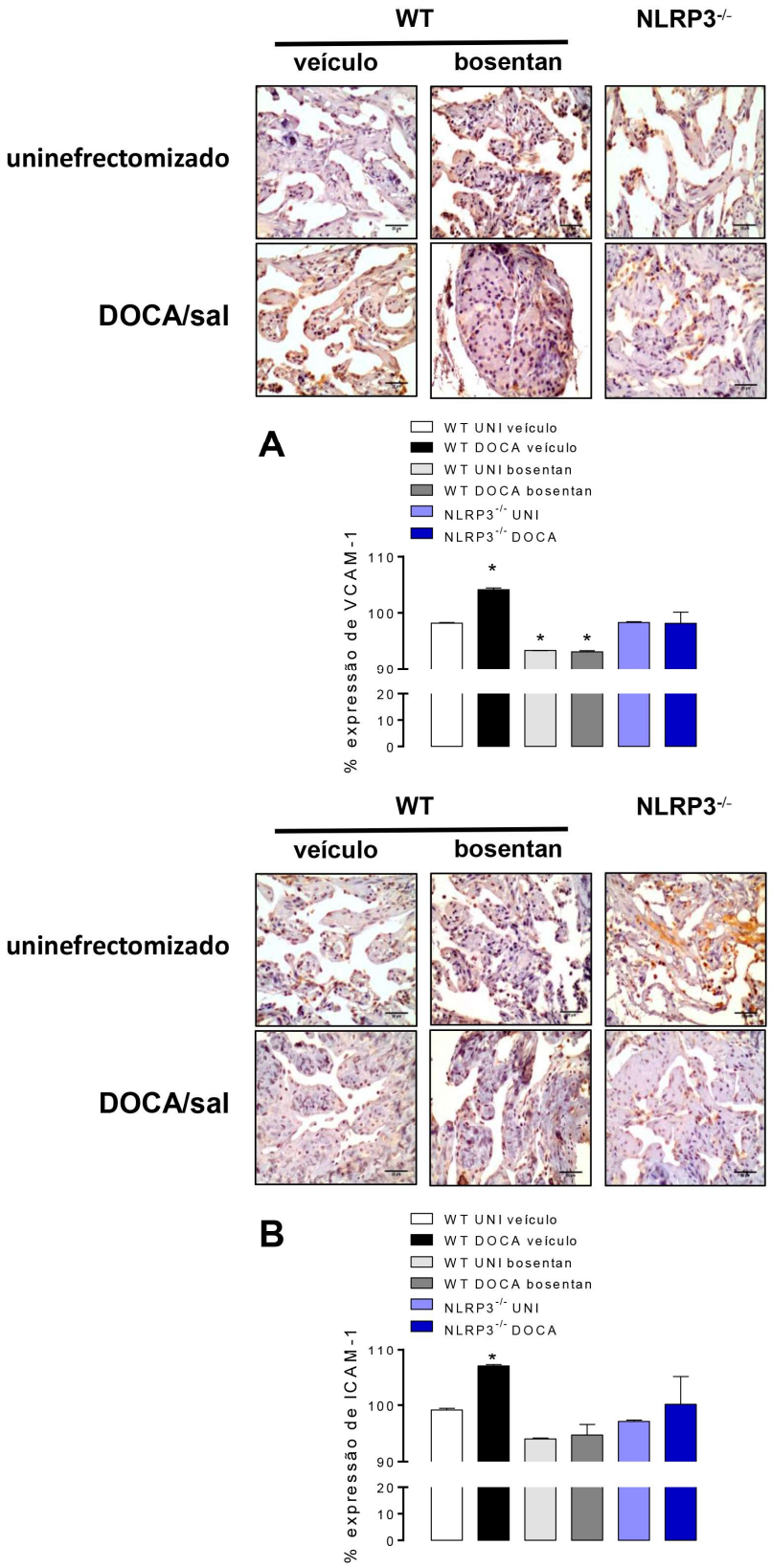


Figura 23. Análise microscópica imuno-histoquímica da expressão de VCAM-1 (**A**) e de ICAM-1 (**B**) em tiras do CC de camundongos WT submetidos a hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou veículo e animais NLRP3$^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * $p<0,05$ comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

5.11. O NLRP3 medeia o aumento da camada de músculo liso e na deposição de colágeno induzido pela ET-1 no CC de camundongos hipertensos DOCA/sal.

O CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal apresentou aumento na marcação para alfa-actina no músculo liso. O tratamento com bosentan não apenas de preveniu o aumento de alfa-actina no músculo liso do CC de animais DOCA/sal, mas reduziu significativamente a marcação para alfa-actina no músculo liso do CC de animais do grupo controle tratado com bosentan (**Figura 24A**). Entretanto, a ausência do NLRP3 não normalizou, mas apenas atenuou a expressão de alfa-actina no músculo liso do CC de animais hipertensos DOCA/sal quando comparados com os animais NLRP3$^{-/-}$ uninefrectomizados (**Figura 24A**).

A hipertensão DOCA/sal aumentou a deposição de colágeno no CC dos camundongos. No entanto, o tratamento com bosentan reduziu significativamente a deposição de colágeno no CC dos camundongos DOCA/sal em relação ao animais uninefrectomizados. A ausência do NLRP3 preveniu o aumento da deposição de colágeno no CC de camundongos DOCA/sal (**Figura 24B**).

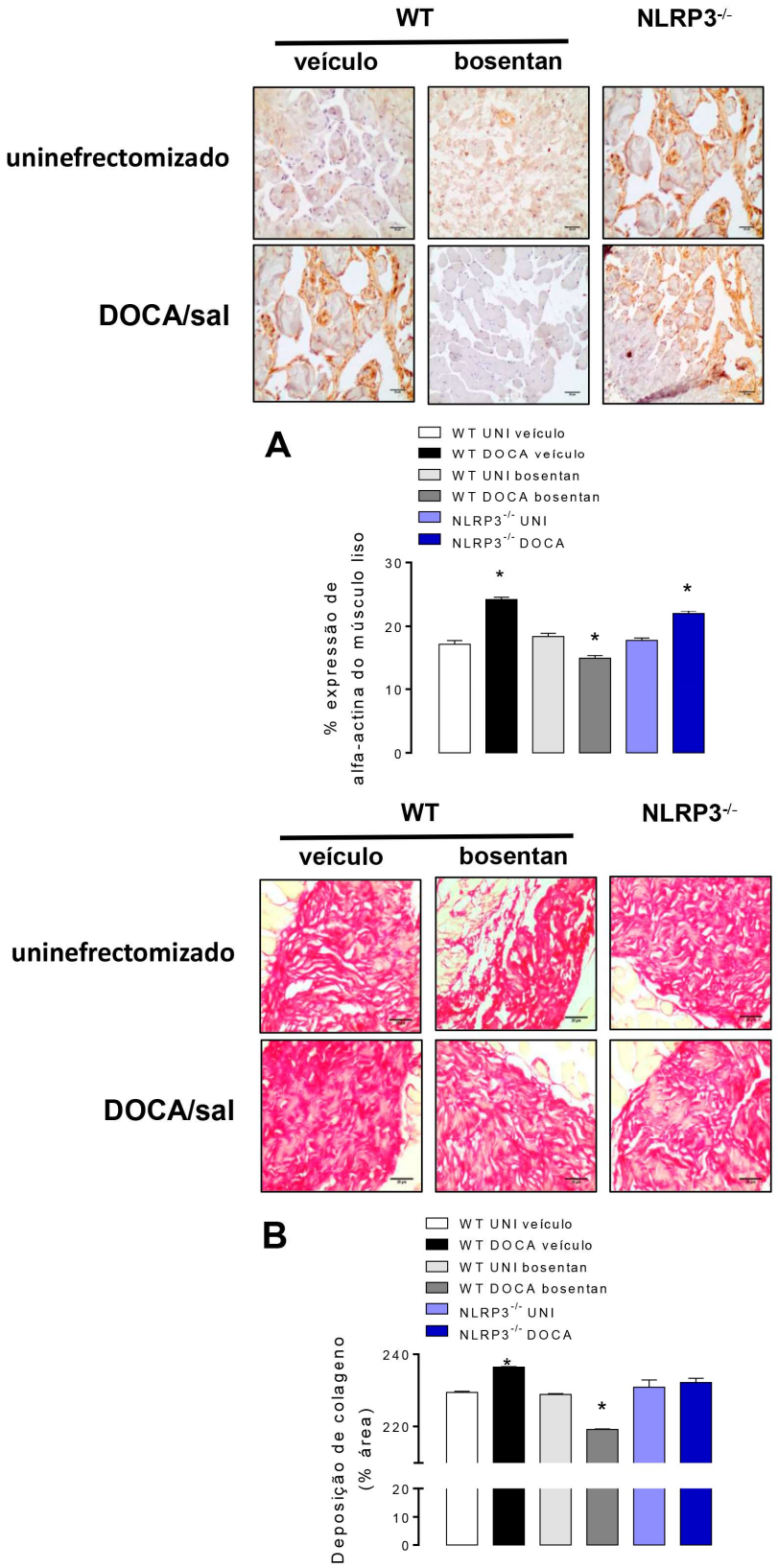


Figura 24. Representação microscópica imuno-histoquímica da expressão de α-actina do músculo liso (**A**), e deposição de colágeno (**B**) em tiras do CC de camundongos WT submetidos a hipertensão DOCA/sal e tratados com bosentan ou veículo e animais NLRP3$^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * $p<0,05$ comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

5.12. O aumento na pressão arterial em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da ação de neutrófilos.

A depleção de neutrófilos restaurou a pressão arterial de camundongos hipertensos DOCA/sal a níveis basais no terceiro dia de tratamento após a administração de BE0075-1 (**Figura 25**).

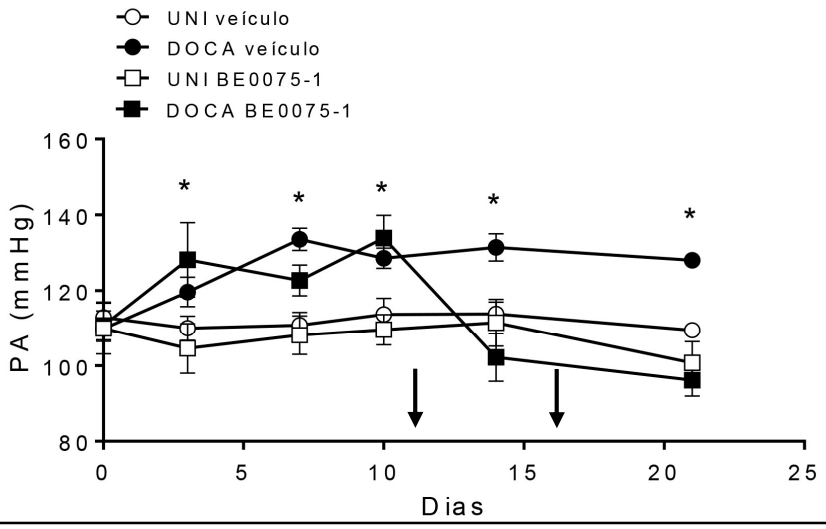


Figura 25. Análise temporal da pressão arterial sistólica, em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal e tratados com BE0075-1. As setas indicam a administração do BE0075-1 nos dias 12 e 17. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6-10.

5.13. O aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da caspase-1 no CC de camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da ação de neutrófilos.

A depleção de neutrófilos atenuou a expressão da IL-1β (**Figura 26A**) e atenuou a expressão da caspase-1 (**Figura 26C**) no CC de camundongos DOCA/sal.. Entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada na expressão da pró-IL-1β (**Figura 26B**) ou pró-caspase-1 (**Figura 26D**).

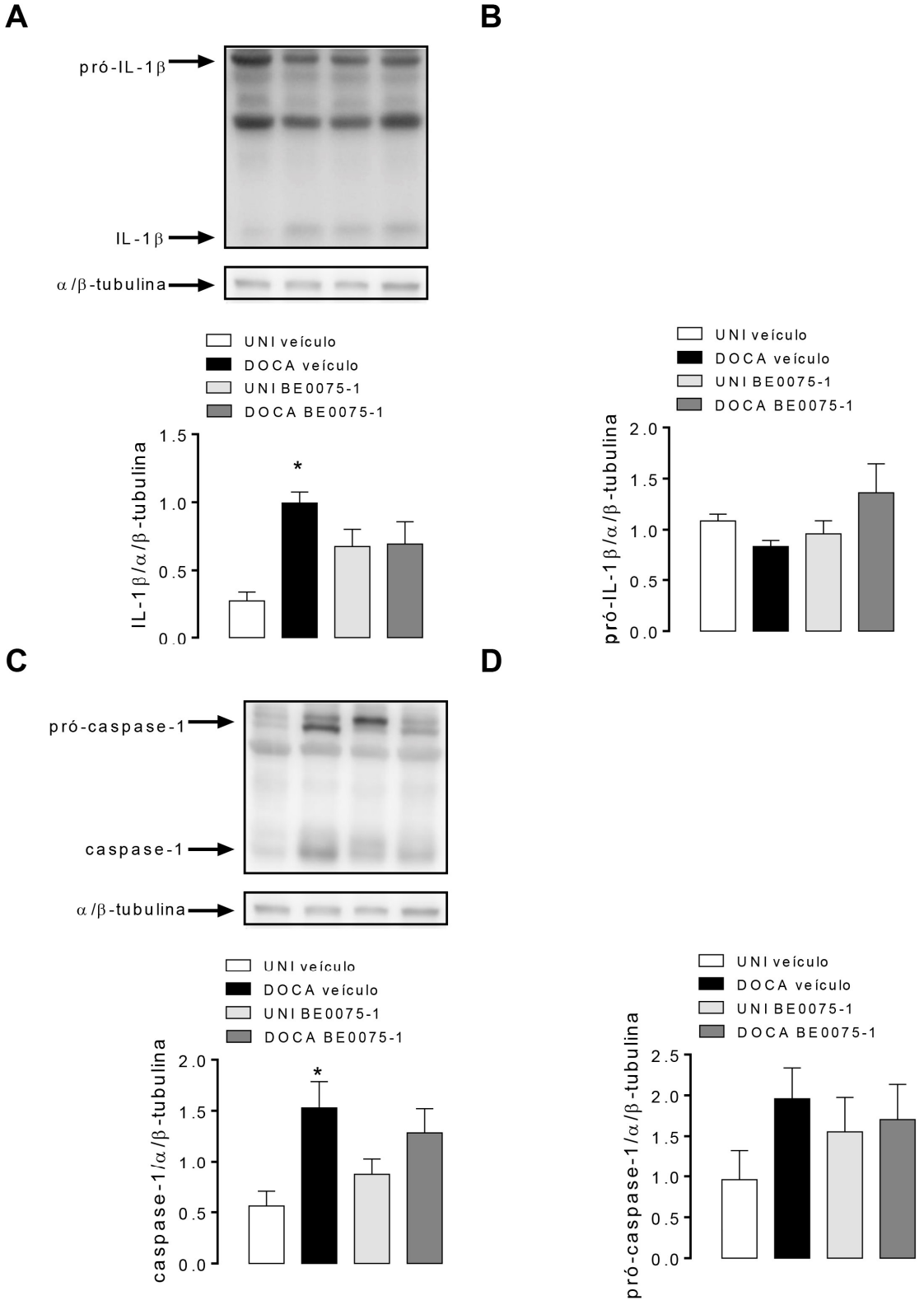


Figura 26. Análise densitométrica da IL-1β (**A**), pró-IL-1β (**B**), caspase-1 (**C**) e pró-caspase-1 (**D**) no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, tratados nos dias 11 e 16 com BE0075-1 ou salina. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

5.14. A ação de neutrófilos prejudica a função erétil e a reatividade do CC em camundongos com hipertensão DOCA/sal.

O tratamento com BE0075-1 restaurou completamente a função erétil nos camundongos DOCA/sal. Adicionalmente, o BE0075-1 promoveu aumento da função erétil nos camundongos uninefrectomizados e DOCA/sal nas frequências de 0,2 a 2 Hz (**Figura 27**).

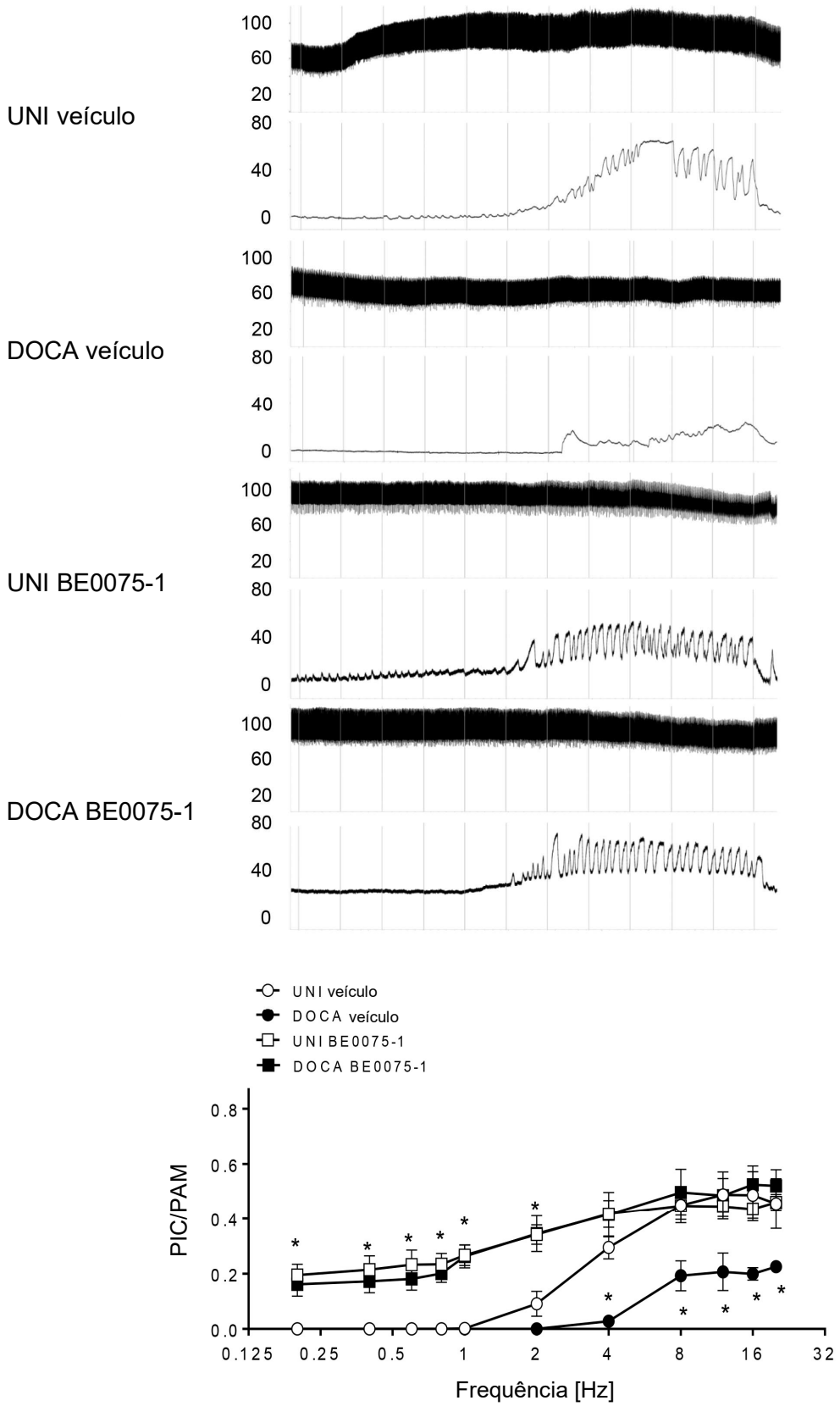


Figura 27. Traçado representativo da pressão arterial e da pressão intracavernosa de camundongos uninefrectomizados ou DOCA/sal tratados com veículo ou BE0075-1. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05, comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

As curvas para contração induzida pela fenilefrina (**Figura 28A**) ou relaxamento mediado por estímulo elétrico (**Figura 28B**) em tiras de CC de camundongos DOCA/sal não apresentaram diferença quando comparadas com o respectivo controle. Entretanto, as tiras de CC de camundongos DOCA/sal apresentaram prejuízo no relaxamento para acetilcolina (**Figura 28C**) e para nitroprussiato de sódio (**Figura 28D**).

O tratamento com BE0075-1 diminuiu a pEC_{50} para as curvas de contração para fenilefrina (**Figura 28A**) nas tiras de CC de camundongos uninefrectomizados e DOCA/sal. Além disso, o BE0075-1 restaurou o relaxamento para acetilcolina (**Figura 28C**) e nitroprussiato de sódio (**Figura 28D**) aos níveis basais nas tiras de CC de camundongos DOCA/sal. Os valores para a Emax e pEC_{50} estão expressos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Valores de Emax (%) e pEC_{50} para as curvas de concentração efeito para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio no CC de camundongos uninefrectomizados ou DOCA/sal.

Efeito do tratamento com BE0075-1 na reatividade do CC de camundongos submetidos a hipertensão DOCA/sal				
Droga	UNI veículo	DOCA veículo	UNI BE0075-1	DOCA BE0075-1
fenilefrina				
pEC_{50}	5,85 ± 0,14	5,93 ± 0,12	5,13 ± 0,17*	5,32 ± 0,17*
Emax	1145 ± 70,08	1295 ± 92,42	1249 ± 217,9	1396 ± 166,1
acetilcolina				
pEC_{50}	7.20 ± 0,08	6.55 ± 0,12*	7,19 ± 0,11	7,55 ± 0,13
Emax	95,02 ± 3,01	82,21 ± 4,96	91,33 ± 3,89	87,77 ± 3,90
nitroprussiato de sódio				
pEC_{50}	7,16 ± 0,07	6.36 ± 0,05*	7,39 ± 0,14	7.27 ± 0,14
Emax	100	100	100	100

Valores são representados como média ± EPM (n=5-6 cada grupo). * $p<0.05$ UNI veículo vs DOCA veículo, UNI BE0075-1 vs DOCA BE0075-1.

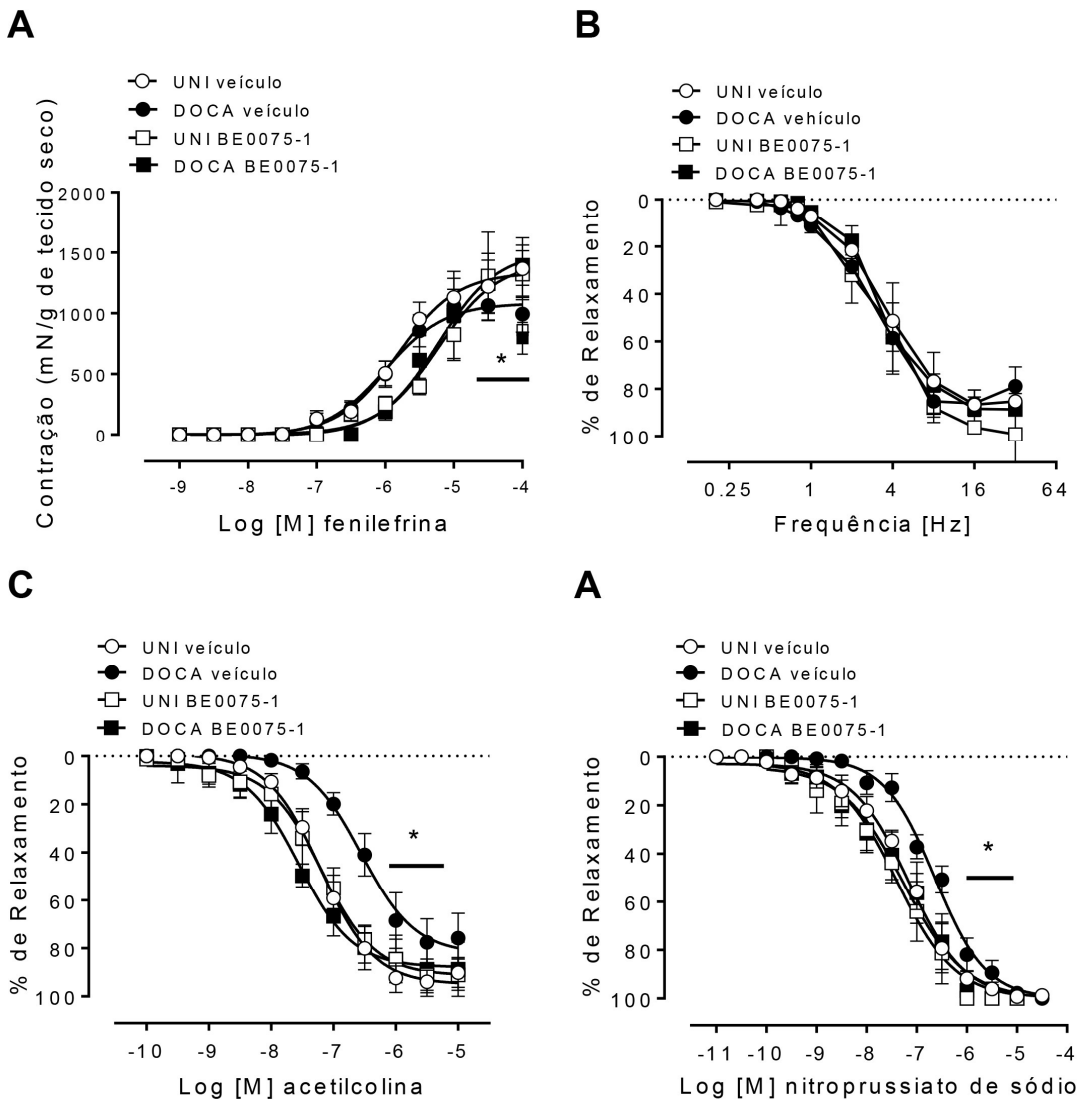


Figura 28. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (**A**), relaxamento mediado por estímulo elétrico (**B**), acetilcolina (**C**) e nitroprussiato de sódio (**D**) em tiras de CC de camundongos uninefrectomizados ou DOCA/sal tratados com veículo ou BE0075-1. Dados expressos como média ± EPM. *, p<0,05 em relação grupo controle. N=6.

5.15. O aumento na pressão arterial em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da ação de linfócitos.

A ausência de linfócitos preveniu o aumento na pressão arterial de camundongos com modelo de hipertensão DOCA/sal. Adicionalmente, a ausência de linfócitos não alterou a pressão arterial nos camundongos controle (**Figura 29**).

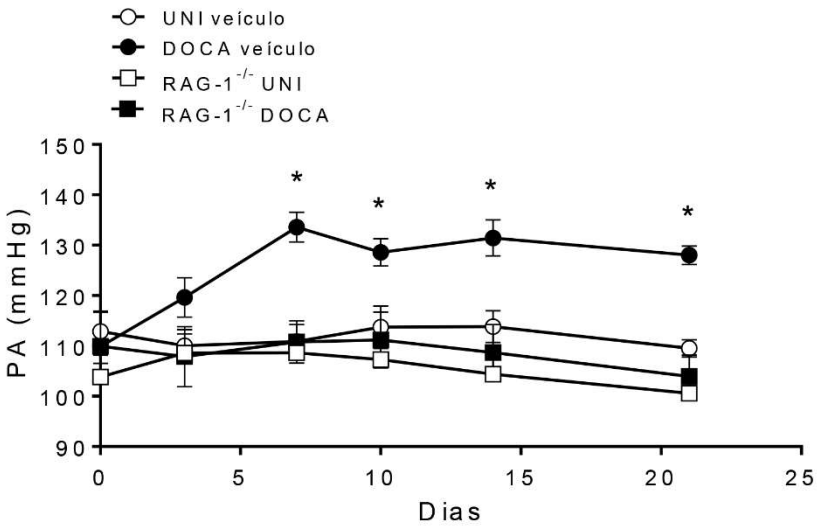


Figura 29. Análise temporal da pressão arterial sistólica, em camundongos WT ou RAG-1$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6-10.

5.16. O aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação da caspase-1 em camundongos com hipertensão DOCA/sal depende da ação de linfócitos.

O aumento da expressão da IL-1 β no CC de camundongos DOCA/sal não foi abolida quando a hipertensão foi induzida em camundongos RAG-1$^{-/-}$ (**Figura 30A**). Entretanto, o aumento na expressão da caspase-1 no CC de camundongos DOCA/sal foi prevenido quando animais RAG-1$^{-/-}$ foram submetidos ao protocolo de hipertensão DOCA/sal (**Figura 30C**). Nenhuma alteração significativa foi observada na expressão da pró-IL-1β (**Figura 30B**). Curiosamente, houve aumento da expressão de pró-

caspase-1 no CC de camundondos DOCA/sal WT. Contudo, o aumento na expressão da pró-caspase-1 foi prevenido (**Figura 30D**) em camundongos RAG-1$^{-/-}$ submetidos a hipertensão DOCA/sal.

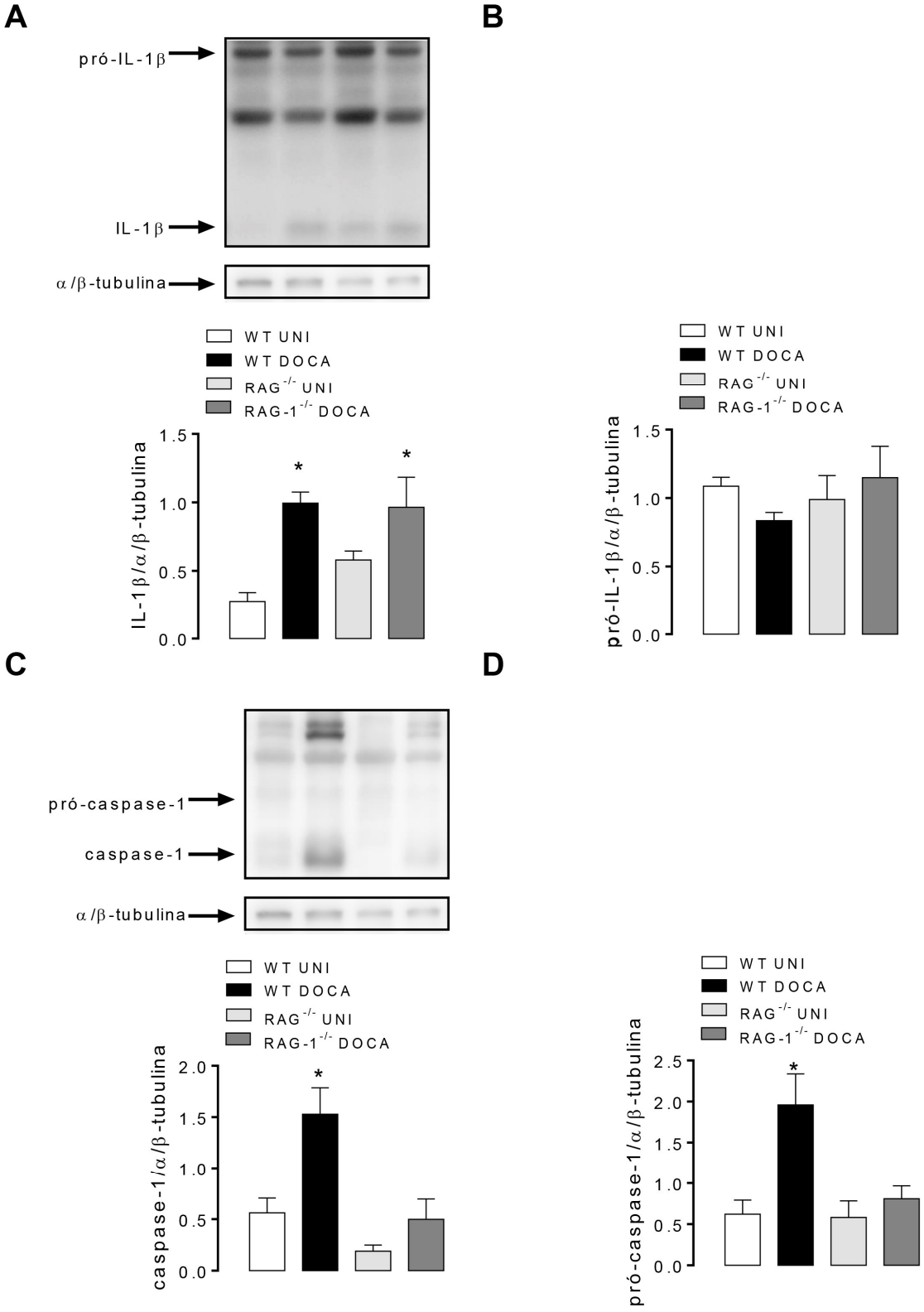


Figura 30. Análise densitométrica da IL-1β (**A**), pró-IL-1β (**B**), caspase-1 (**C**) e pró-caspase-1 (**D**) no CC de camundongos WT e RAG-1$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

5.17. A ação de linfócitos altera a função erétil e a reatividade do CC em camundongos com hipertensão DOCA/sal.

A ausência de RAG-1 melhorou a função erétil nos camundongos uninefrectomizados nas frequências de 0,2 a 0,8 Hz. Adicionalmente, os camundongos RAG$^{-/-}$ quando submetido ao protocolo DOCA/sal tiveram a função erétil preservada somente nas frequências de 4 e 8 Hz. Entretanto, houve um prejuízo na função erétil em camundongos RAG-1$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal nas frequências de 12 a 20 Hz (**Figura 31**).

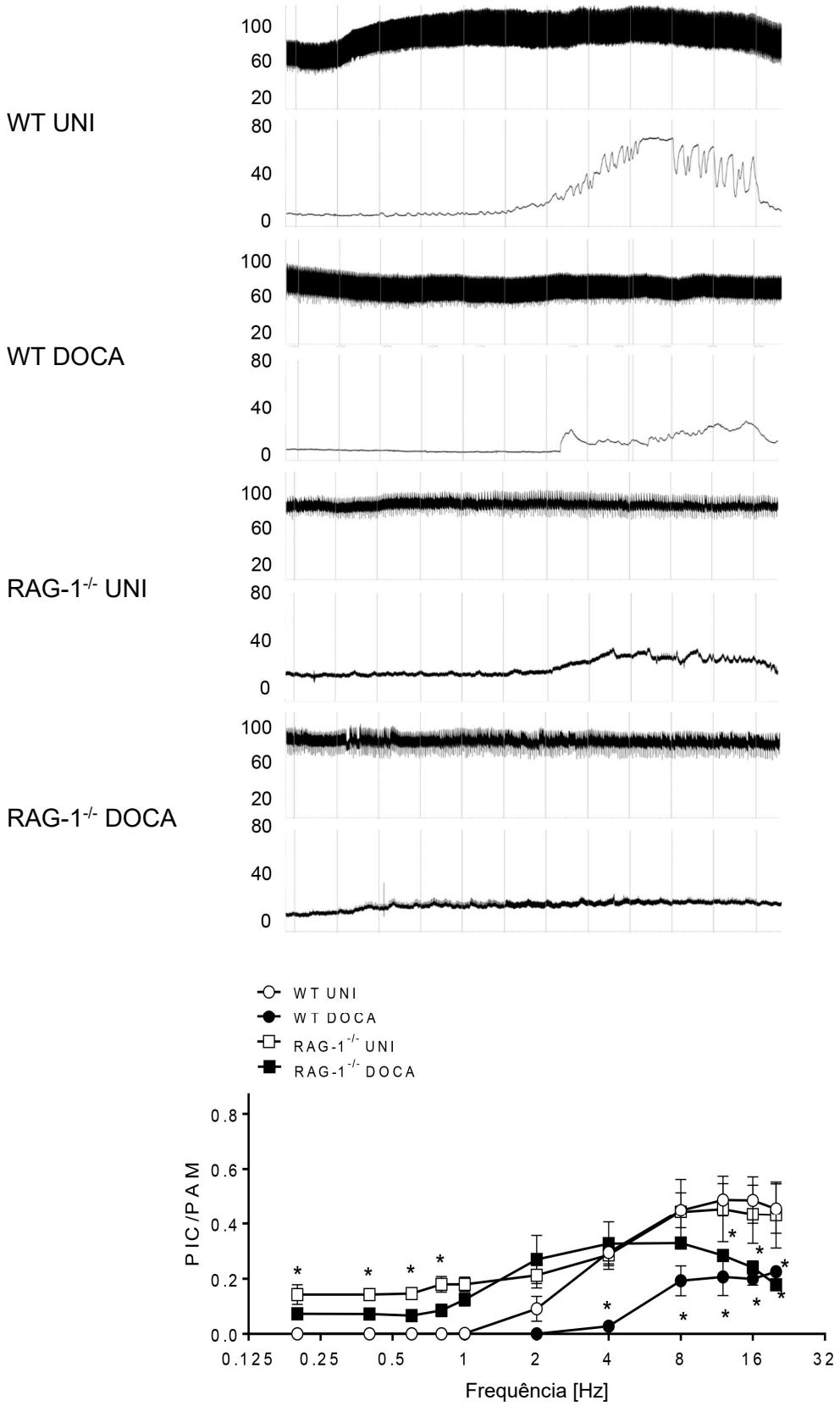


Figura 31. Traçado representativo da pressão arterial e da pressão intracavernosa de camundongos WT ou RAG-1$^{-/-}$ uninefrectomizados ou DOCA/sal. Análise da função erétil, representada pela razão entre a pressão intracavernosa e a pressão arterial média (PIC/PAM) em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Os valores dos gráficos representam a média ± EPM. * P<0,05, comparado com o respectivo grupo controle. N=6.

A ausência de linfócitos diminuiu a pEC_{50} para as curvas de contração para fenilefrina (**Figura 32A**) nas tiras de CC de camundongos uninefrectomizados e DOCA/sal. Entretanto, as tiras de CC dos camundongos DOCA/sal e RAG-1$^{-/-}$ apresentou apretentatam Emax maior. Adicionalmente, não foi observada alteração significativa no relaxamento para estímulo elétrico nas tiras de CC de camundongos uninefrectomizados e DOCA/sal RAG-1$^{-/-}$ (**Figura 32B**).

As tiras de CC de camundongos DOCA/sal apresentaram prejuízo no relaxamento para acetilcolina (**Figura 32C**) e para nitroprussiato de sódio (**Figura 32D**). Além disso, a ausência de RAG$^{-/-}$ preveniu o prejuízo as curvas de relaxamento para acetilcolina (**Figura 32C**) no CC de camundongos DOCA/sal quando comparado com as tiras de camundongos uninefrectomizados. Embora a pEC_{50} para o relaxamento as tiras de CC dos camundongos DOCA/sal RAG-1$^{-/-}$ esteja reduzida quando comparada as tiras de CC de camundongos WT. Curiosamente, as tiras de CC de camundongos RAG-1$^{-/-}$ uninefrectomizados apresentaram aumento no relaxamento para nitroprussiato de sódio (**Figura 32D**). Contudo, o prejuízo para relaxamento para nitroprussiato de sódio não foi prevenido nas tiras de CC de camundongos RAG-1$^{-/-}$ DOCA/sal. Os valores de Emax e pEC_{50} estão expressos na **Tabela 8**.

Tabela 8. Valores de Emax (%) e pEC_{50} para as curvas de concentração efeito para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio no CC de camundongos uninefrectomizados ou DOCA/sal.

Efeito da ausência do RAG-1 na reatividade do CC de camundongos submetidos a hipertensão DOCA/sal				
Droga	WT UNI	WT DOCA	RAG-1$^{-/-}$ UNI	RAG-1$^{-/-}$ DOCA
fenilefrina				
pEC_{50}	5,85 ± 0,14	5,93 ± 0,12	4,93 ± 0,19*	4,68 ± 0,11*
Emax	1145 ± 70,08	1295 ± 92,42	2164 ± 468.2*	2366 ± 250,6*
acetilcolina				
pEC_{50}	7.20 ± 0,08	6.55 ± 0,12*	6,88 ± 0,10	6,64 ± 0,12*
Emax	95,02 ± 3,01	82,21 ± 4,96	86,63 ± 3,70	92,91 ± 5,05

nitroprussiato de sódio				
pEC_{50}	7,16 ± 0,07	6.36 ± 0,05*	7,92 ± 0,09*	6,67 ± 0,09*
Emax	100	100	100	100

Valores são representados como a média ± EPM (n=5-6 cada grupo). * p<0.05 WT UNI vs WT DOCA, RAG-1$^{-/-}$ UNI vs RAG-1$^{-/-}$ DOCA.

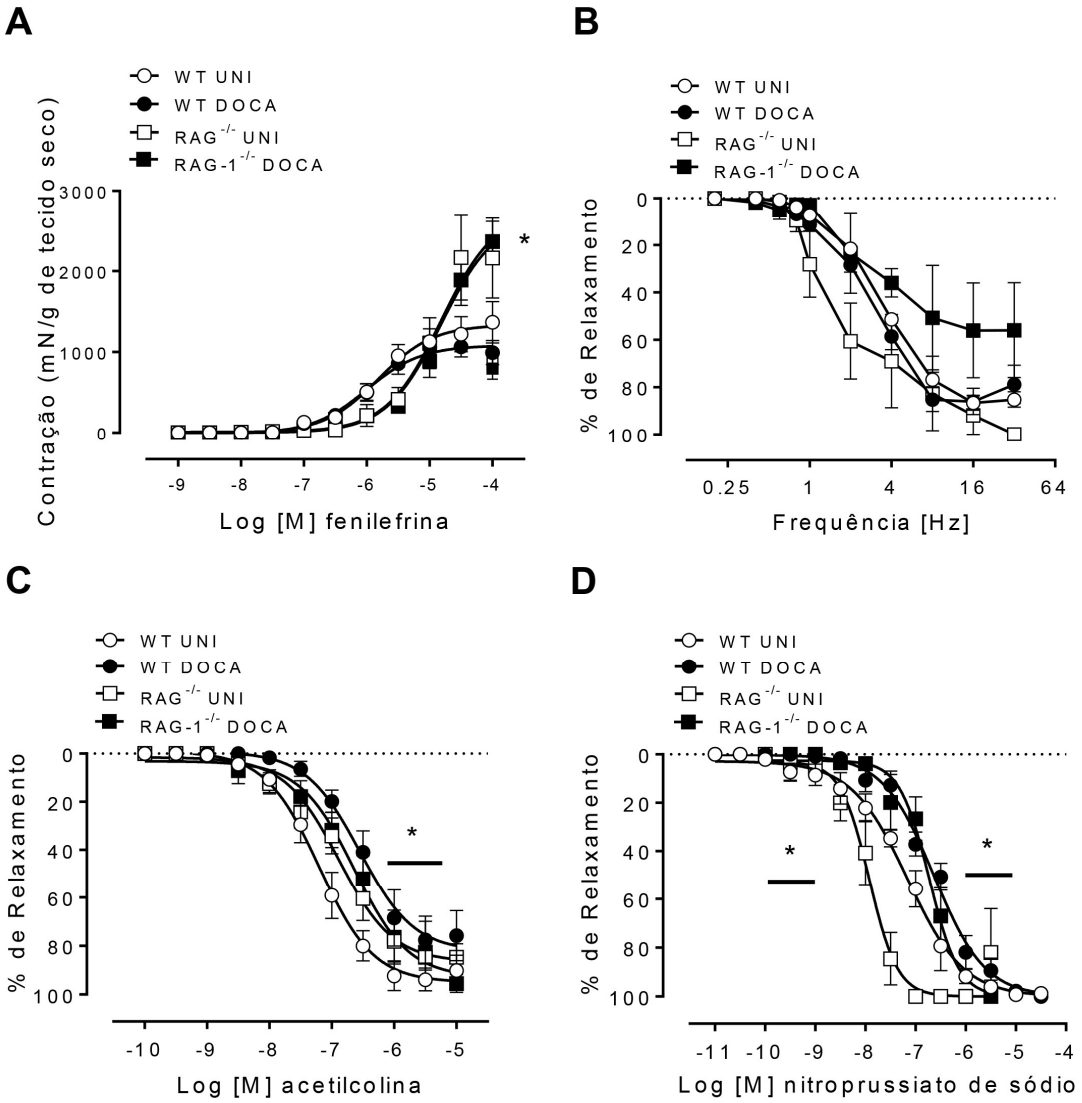


Figura 32. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (**A**), relaxamento mediado por estímulo elétrico (**B**), acetilcolina (**C**) e nitroprussiato de sódio (**D**) em tiras de CC de camundongos WT ou RAG-1$^{-/-}$ uninefrectomizados ou DOCA/sal. Dados expressos como média ± EPM. *, p<0,05 em relação grupo controle. N=6.

6. Discussão

Os resultados do presente estudo indicam que o NLRP3 medeia o efeito da ET-1 em aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células do sistema imune, como neutrófilos e linfócitos para o CC de camundongos submetidos a hipertensão DOCA/sal. Isto parece desempenhar um importante papel no prejuízo da função erétil induzido pelo modelo de hipertensão DOCA/sal.

O modelo de hipertensão DOCA/sal mimetiza os efeitos observados na hipertensão arterial em humanos, como disfunção, hipertrofia e fibrose no sistema cardiovascular (Iyer *et al.*, 2010). Além disso, existe uma grande correlação entre a DE e doenças cardiovasculares, como a hipertensão (Feldman *et al.*, 2000; Carson, 2007). Diversos estudos demonstraram que o modelo de hipertensão DOCA/sal prejudica a função erétil mensurado pela PIC/PAM (Chitaley, Webb*, et al.*, 2001; Carneiro, Nunes*, et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008).

O NLRP3 possui importância muito grande no sistema cardiovascular, uma vez que as células vasculares são capazes de detectar e responder a DAMPs ou PAMPs via TLRs e NLRs e assim promover a liberação de citocinas, quimiocinas e hormônios dilatadores (Schultz *et al.*, 2007; Foldes *et al.*, 2010) que facilitam a transferência e migração de leucócitos para o sítio da lesão (Tousoulis *et al.*, 2008). Com isso, podemos dizer que nossos dados são essenciais para o entendimento de mecanismos que ainda carecem de elucidação, tais como a liberação de marcadores inflamatórios no modelo de hipertensão DOCA/sal, e como estes participam na gênese da DE.

Evidências experimentais e clínicas indicam que o aumento na atividade do sistema imune inato está envolvido na patogênese da DE (Rodrigues *et al.*, 2015; Stallmann-Jorgensen *et al.*, 2015), aterosclerose, síndromes coronarianas agudas, acidentes vasculares cerebrais, miocardite viral, sepse, lesão tecidual por isquemia-reperfusão e insuficiência cardíaca congestiva. O mecanismo exato pelo qual o sistema imune inato atua na gênese da DE ou das doenças cardiovasculares ainda não está muito bem elucidado. Talvez a relação do sistema imune com a DE ou fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares seja a exacerbação do processo inflamatório, contribuindo para o surgimento de lesões teciduais na vasculatura e no CC (Mann, 2011). Reforçando esta sugestão, o aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias está intimamente ligado a gênese da DE (Stallmann-

Jorgensen *et al.*, 2015). Adicionalmente, foi demonstrado que o NLRP3 tem um papel crucial na modulação dos mecanismos responsáveis pelo relaxamento do CC (Fais *et al.*, 2019).

Inicialmente, foi demonstrado que camundongos submetidos ao tratamento DOCA/sal tem aumento da pressão arterial e prejuízo na função erétil. Resultados semelhantes foram demonstrados previamente em vários estudos na literatura (Chitaley, Webb*, et al.*, 2001; Carneiro, Nunes*, et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008). Portanto, os nossos resultados corroboram achados anteriores e validam o modelo de DE utilizado no presente estudo.

Os camundongos submetidos à hipertensão DOCA/sal apresentaram aumento nos níveis sistêmicos de ET-1. De fato, este modelo apresenta aumento da expressão do gene para ET-1, RNA mensageiro da pré-pró-ET-1 e o peptídeo ET-1 em artérias mesentéricas, aorta e no CC (Lariviere *et al.*, 1993; Day *et al.*, 1995; Carneiro, Giachini*, et al.*, 2008). Já é conhecido que a ET-1 eleva a produção de ânion superóxido e isto contribui para o aumento da sua ação contrátil (Li, Watts*, et al.*, 2003). Além disso, o aumento na geração de ânion superóxido está intimamente relacionado com a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Bataller *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007).

Observamos que os camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal têm aumento de TNF-α e IL-1β. De fato, o aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias, está intimamente relacionada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O tratamento com etanercept, inibidor do TNF-α, nitidamente reduziu a lesão renal em ratos com hipertensão DOCA/sal (Elmarakby *et al.*, 2008). Além disso, o do TNF-α está intimamente relacionado com o prejuízo na função erétil (Carneiro *et al.*, 2010). Evidências científicas mostram também que a ET-1 promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, em monócitos (Helset *et al.*, 1993), em células de ligamentos periodontais (Liang *et al.*, 2014), células endoteliais e CMLV (Kowalczyk *et al.*, 2015).

Uma vez que camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal apresentaram prejuízo na função erétil, aumento de ET-1 e citocinas pró-inflamatórias, decidimos investigar o papel da ET-1 neste prejuízo no CC.

O tratamento com bosentan reduziu os níveis de IL-1β e TNF-α no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. De fato, a ET-1 também promove aumento na liberação de TNF-α em CMLV (Browatzki *et al.*, 2000). Esta citocina aumenta a atividade da NAD(P)H oxidase elevando assim a produção de ROS que, por sua vez, aumenta a produção e liberação de quimiocinas e citocinas, levando a um ciclo vicioso na inflamação. Diversos fatores podem interferir com a atividade da NAD(P)H oxidase, como a angiotensina II, altas concentrações de glicose e altos níveis de colesterol, estímulos esses que estão também envolvidos na ativação do NLRP3 (Hoffman e Brydges, 2011).

Além disso, ET-1 aumenta a produção de IL-1β no CC. A IL-1β é o produto da ativação do NLRP3. Portanto, decidimos investigar o papel do NLRP3 no prejuízo da função erétil induzido pela ET-1 no modelo de hipertensão DOCA/sal. Curiosamente, não observamos alteração nos níveis de IL-6 em camundongos DOCA/sal. Entretanto, o tratamento com bosentan reduziu os níveis de IL-6 nos animais uninefrectomizados.

O tratamento com bosentan reduziu a atividade da caspase-1 no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/SAL. A caspase-1 é responsável por clivar a IL-1β e IL-18 em resposta a DAMPs ou PAMPs. Os membros da familia NLR são responsáveis pela ativação da caspase-1, através da proteina ASC ou ligando-se diretamente através de seu domínio CARD (Mariathasan e Monack, 2007; Franchi *et al.*, 2009; Martinon *et al.*, 2009). Após constatarmos que a ET-1 aumenta a atividade da caspase-1 em camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, o próximo passo foi investigar se isto promovia alterações funcionais.

Curiosamente, já foi demonstrado uma relação negativa entre os níveis de ET-1, ativação do NLRP3, caspase-1 e liberação de IL-1β em células do hipocampo (HT22) (Ward e Ergul, 2016). Entretanto, dados ainda não publicados de nosso laboratório também demonstram que a ausência do NLRP3 ou da caspase-1 previnem o prejuízo na reatividade do CC promovidas pela ET-1.

O tratamento com o bosentan, antagonista de receptores ET_A e ET_B, reverteu completamente o aumento na pressão arterial e o prejuízo na função erétil promovido pela hipertensão DOCA/sal. O tratamento por 3 semanas com bosentan reduziu a pressão arterial, a hipertrofia e o remodelamento arterial em ratos DOCA/sal (Li *et al.*, 1994). Além disso, o A-127722 ou o BMS182874, antagonistas ET_A, reduziram a

fibrose do ventrículo esquerdo, a inflamação (Ammarguellat *et al.*, 2001; Ammarguellat *et al.*, 2002), a hipertrofia renal e cardíaca em ratos DOCA/sal (Ammarguellat *et al.*, 2002). Além disso, ratos com hipertensão DOCA/sal tratados com atrasentan, um antagonista ET_A, apresentaram melhora na função erétil e na reatividade do CC (Carneiro, Nunes*, et al.*, 2008).

O tratamento com bosentan reverteu o prejuízo promovido pela hipertensão DOCA/sal nos relaxamentos dependente e independente de endotélio. De fato, o modelo de hipertensão DOCA/sal está intimamente associado à disfunção endotelial, principalmente via aumento da expressão de ET-1 e redução da fosforilação da eNOS em anéis de aorta (Gomez-Guzman *et al.*, 2012). Similarmente, foi demonstrado que o incremento na expressão de receptores ET_A (Viel *et al.*, 2008) ou gene para ET-1 (Lariviere *et al.*, 1995), prejudica a função endotelial promovendo estresse oxidativo, por meio da xantina oxidase, na aorta e artéria mesentérica de ratos DOCA/sal.

O prejuízo para relaxamento mediado por nitroprussiato de sódio pode ocorrer, devido a ET-1 induzir, além da ativação da via da RhoA/RhoK, a formação de ROS, que pode reduzir a biodisponibilidade de NO pela formação de peroxinitrito. Alguns estudos mostram que a ET-1 aumenta a produção de O_2^- na aorta de ratos, via ativação de receptores ET_A (Galle *et al.*, 2000), possivelmente por meio da ativação da NAD(P)H oxidase (Li, Watts*, et al.*, 2003). Além disso, Carneiro, Nunes*, et al.* (2008) mostraram que ratos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal tem a função erétil prejudicada, devido ao aumento da atividade da via da RhoA/Rho-cinase e ERK 1/2, e o tratamento com antagonista ET_A reverteu essas alterações.

Uma vez demonstrado que o aumento de ET-1 leva a disfunção erétil, através do aumento de IL-1β, TNF-α, caspase-1, promovendo assim disfunção endotelial e do músculo liso do CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal, decidimos estudar se a atividade do inflamassoma NLRP3 estaria envolvido no prejuízo na função erétil.

A ausência do NLRP3 reduziu a liberação de IL-1β e TNF-α no CC de camundongos DOCA/sal. As citocinas, como a IL-1β e IL-18, que são produtos finais da ativação do NLRP3, tem efeitos específicos na vasculatura, em células endoteliais, CMLV e na matriz extracelular, como a regulação do tônus vascular, além da sinalização de vias que promovem vasoconstrição e/vasodilatação, crescimento celular e proliferação, levando a mudanças estruturais no leito vascular (Sprague e

Khalil, 2009; Imai *et al.*, 2013). Uma vez que o CC possui estruturas similares ao leito vascular, acredita-se que alterações estruturais promovidas pela ativação do NLRP3 no CC também possam promover aumento na liberação de citocinas, disfunção na reatividade do CC, e consequentemente, pode levar à DE.

De fato, a deficiência do receptor NLRP3 preveniu o prejuízo na função erétil promovido pela hipertensão DOCA/sal. Além disso, dados ainda não publicados de nosso laboratório mostram que a ET-1 aumenta a atividade do NLRP3, a liberação de IL-1β e prejudica a reatividade do CC.

A ausência do NLRP3 preveniu o prejuízo promovido pela hipertensão DOCA/sal no relaxamento para acetilcolina e para nitroprussiato de sódio. De fato, já foi observado que o NLRP3 é responsável pela proliferação de células de músculo liso isoladas de aortas de camundongos, isto representa um importante marcador para remodelamento e prejuízo na reatividade vascular (Ren *et al.*, 2017). Adicionalmente, em modelo de infusão de aldosterona, o NLRP3 prejudicou o relaxamento dependente de endotélio para acetilcolina em artérias de resistência de camundongos (Bruder-Nascimento *et al.*, 2016). Além disso, recentemente mostramos que o aumento da atividade do NLRP3 no CC, por meio da incubação com lipopolissacarídeo seguido por adenosina trifosfato (ATP), prejudica o relaxamento dependente de endotélio pra acetilcolina e também para nitroprussiato de sódio. Isto ocorre principalmente devido ao NLRP3 reduzir a atividade da eNOS (resíduo de serina 1177) e a expressão da guanilato ciclase-β (GCβ) (Fais *et al.*, 2019).

Uma vez demonstrado que a ET-1 prejudica a função erétil, por meio da atividade do NLRP3, em modelo de hipertensão DOCA/sal. Decidimos então investigar os possíveis mecanismos que poderiam estar relacionados com este prejuízo.

O tratamento com bosentan ou a deleção gênica do NLRP3, respectivamente reduziu ou preveniu o aumento de neutrófilos no CC de camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. Reconhecidamente, a ET-1 aumenta os níveis de TNF-α, IL-1β e IL-6 (Yeager *et al.*, 2012), a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (Li, Chu*, et al.*, 2003; Callera *et al.*, 2004), estimula a agregação de NPM e contribui para o aumento do processo inflamatório e disfunção endotelial. Além

disso, já foi demonstrado que cristais de colesterol, em modelo de aterosclerose em camundongos, promovem ativação do NLRP3 ou dos componentes para formação do inflamassoma, aumentam o acúmulo de neutrófilos e a formação de complexos conhecidos *neutrophils extracelular trap*s (NETs) (Westerterp *et al.*, 2018). Do mesmo modo, os cristais de colesterol ativam linfócitos Th17 e amplificam o recrutamento de células do sistema imune para as placas de ateroma (Warnatsch *et al.*, 2015).

Os NPMs promovem danos no miocárdio através do aumento na liberação de ROS, proteases e metabólitos do ácido araquidônico (Hansen, 1995). A ET-1 é responsável pelo acúmulo de NPMs, estresse oxidativo e disfunção na mucosa intestinal de ratos (Oktar *et al.*, 2000). O bloqueio de receptores ET_A reduz o número de neutrófilos e a atividade da mieloperoxidase no miocárdio isquêmico (Gonon *et al.*, 2001). Ademais, a deleção do gene que codifica a pré-pró-ET-1 em células endoteliais de camundongos reduz a inflamação vascular promovida pela ligação da artéria carótida (Anggrahini *et al.*, 2009).

O NLRP3 também é responsável por regular a função de neutrófilos e promover lesão hepática em modelo de isquemia e reperfusão em camundongos (Inoue *et al.*, 2014). De fato, o aumento de IL-1β e caspase-1 promovem recrutamento e ativação de células autoimunes como neutrófilos, no sítio de infecção ou devido a dano tecidual em órgãos terminais (Latz *et al.*, 2013). Além disso, a IL-1β aumenta a severidade da placa de ateroma na aorta de camundongos deficientes para apolipoproteina E, possivelmente através do aumento da expressão de VCAM-1 e proteína quimioatrativa de monócitos-1 (*monocyte chemotactic protein-1*, MCP-1).

Adicionalmente, existem evidências que o sistema imune adaptativo também desempenha um grande papel na gênese e agravamento da hipertensão (Harrison *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2011; Marvar *et al.*, 2012). De fato, camundongos deficientes para $RAG1^{-/-}$ [RAG (não apresentam linfócitos)], são resistentes a desenvolver hipertensão nos modelos por infusão de angiotensina II e DOCA/sal. Entretanto, quando estes animais $RAG1^{-/-}$ recebem linfócitos T, mas não B, passam a desenvolver hipertensão (Guzik *et al.*, 2007; Marvar *et al.*, 2009). Estes linfócitos liberam citocinas pró-inflamatórias que promovem aumento da vasoconstrição e retenção de sódio, levando ao aumento da pressão arterial (Guzik *et al.*, 2007; Madhur *et al.*, 2010).

Uma vez mostrado que o aumento da atividade do NLRP3 por meio da ET-1 promove prejuízo na função erétil e aumento no recrutamento de neutrófilos e

linfócitos no CC de camundongos. Decidimos investigar os mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos e linfócitos.

Assim, observamos que o tratamento com bosentan ou a deleção gênica do NLRP3, respectivamente, reverteu ou preveniu o aumento na expressão fatores que promovem recrutamento de células do sistema imune, como VCAM-1, ICAM-1 e CCL2. A ET-1 tem um grande papel na liberação de quimiocinas como MCP-1, proteína inflamatória de macrófagos-1α [monocyte Inflammatory protein(MIP-1α)] ou RANTES (Molet *et al.*, 2000). Adicionalmente, essas quimiocinas modulam a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1, além de induzir a liberação de diversos mediadores por neutrófilos e linfócitos Th1 (Vaddi e Newton, 1994).

A ET-1 estimula VCAM-1 arterial em pacientes com hipertensão arterial (Li, Chu*, et al.*, 2003). A VCAM-1 e ICAM-1 são responsáveis pela adesão de células do sistema imune no leito vascular (Blankenberg *et al.*, 2003). A ET-1 também promove proliferação de células de músculo liso vascular (Li *et al.*, 2010)(Li, 2010). Já foi observado que a ET-1, por meio de receptores ET_A, promove aumento da formação do complexo enzimático da NAD(P)H oxidase e eleva a pressão arterial em ratos DOCA/sal (Callera *et al.*, 2006). Além disso, o tratamento com BMS 182874, antagonista seletivo para receptores ET_A, reduz significativamente a atividade de ICAM-1, VCAM-1 e a mieloperoxidase (Callera *et al.*, 2004). Além disso, existem receptores para ET-1 em linfócitos T. Estes linfócitos T são responsáveis por modular a expressão de receptores ET_A e ET_B no músculo liso vascular, o que contribui para a progressão da aterosclerose na aorta de pacientes (Iwasa *et al.*, 1999).

O NLRP3 também está intimamente relacionado ao aumento do recrutamento de células do sistema imune, por meio da estimulação de moléculas de adesão ou fatores quimioatrativos. De fato, camundongos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal apresentam prejuízo na função renal, além de aumento de VCAM-1, ICAM-1 e CCL2 no rim. No entanto, o tratamento com MCC950, um inibidor seletivo do NLRP3, restaura a função renal e reduz a expressão destes fatores (Krishnan *et al.*, 2019). Adicionalmente, o NLRP3 também promove aumento de VCAM-1 e ICAM-1 em modelo de infusão de aldosterona (Bruder-Nascimento *et al.*, 2016) ou de aterosclerose induzida por diabetes (Wan *et al.*, 2019) em camundongos.

A integridade estrutural do CC é importante para função erétil. Adicionalmente, as células do sistema imune têm grande papel promovendo fibrose e aumento da camada média no leito vascular. Desta forma, verificamos possíveis alterações estruturais promovidas pela ET-1 ou o NLRP3 no modelo de hipertensão DOCA/sal. Para tal, determinamos a deposição de colágeno e avaliamos mudanças na quantidade de músculo liso.

Observamos que houve fibrose e aumento proliferação de músculo liso nos cortes de tiras do CC de camundongos WT DOCA/sal e, o tratamento com bosentan ou a ausência do NLRP3 reverteu ou preveniu a fibrose e o aumento na proliferação de músculo liso. O modelo de hipertensão DOCA/sal e a hipertensão arterial em humanos compartilham grande parte das alterações ocorridas no leito vascular como hipertrofia, fibrose (Mirkovic *et al.*, 2002) e disfunção endotelial. Adicionalmente, a Hipertensão DOCA/sal é conhecida por provocar hipertrofia cardíaca (Loch *et al.*, 2006; O'brien *et al.*, 2010) e renal (Klanke *et al.*, 2008) de ratos. Além disso, a hipertensão DOCA/sal promove hipertrofia em pequenas e grandes artérias em ratos, com proeminente espessamento da camada média por meio da atividade da ET-1 (Deng e Schiffrin, 1992).

A ET-1, por meio de receptores ET_A, tem um grande papel na hipertrofia e fibrose no coração (Ammarguellat *et al.*, 2001; Ammarguellat *et al.*, 2002). Além disso, a ET-1 também promove proliferação de células de músculo liso vascular (Li *et al.*, 2010). Adicionalmente, a inibição farmacológica do NLRP3 restaura a função renal e previne o aumento da fibrose renal em camundongos DOCA/sal (Krishnan *et al.*, 2019)

Uma vez demonstrado os mecanismos envolvidos e as alterações morfológicas promovidas pela ET-1 no recrutamento de neutrófilos e linfócitos Th1, e que este efeito é mediado via aumento da atividade do NLRP3, decidimos investigar se os neutrófilos e linfócitos estariam envolvidos na gênese e agravamento da disfunção erétil na hipertensão arterial.

Inicialmente, foi demonstrado que a depleção de neutrófilos reduz a IL-1β e atenua a caspase-1 no CC de camundongos DOCA/sal. De fato, neutrófilos são cruciais para modulação da inflamação vascular (Phillipson e Kubes, 2011). Além disso, já foi demonstrado em modelo experimental de artrite, que a produção de IL-1β em neutrófilos não é dependente de caspase-1 (Guma *et al.*, 2009). O NLRP3 também regula a função dos neutrófilos em modelo de isquemia e reperfusão hepática em

camundongos (Inoue *et al.*, 2014). De fato, a atividade dos componentes do inflamassoma NLRP3, assim como a ET-1 está ligada ao recrutamento e atividade dos neutrófilos e alterações morfológicas no CC de camundongos DOCA/sal. Desta forma, decidimos investigar se o aumento de neutrófilos e linfócitos Th1 têm algum papel na regulatório na função erétil.

A depleção de neutrófilos restaura a pressão arterial, função erétil e vascular em camundongos submetidos a hipertensão DOCA/sal. Diversos estudos mostraram o papel do aumento do recrutamento de neutrófilos na gênese e agravamento da hipertensão (Jackson *et al.*, 1992; Ofosu-Appiah *et al.*, 1997; Kristal *et al.*, 1998; Chatterjee *et al.*, 2007; Morton *et al.*, 2008). Isto ocorre principalmente por meio de sua ação pró-oxidativa e pró-inflamatória. Além isso, a produção do NO por meio da iNOS em neutrófilos parece tem um grande papel no prejuízo na função vascular em ratos (Chatterjee *et al.*, 2007).

Neutrófilos, através de sua ação proteolítica, tem ação oxidativa e citotóxica no endotélio vascular de ratos espontaneamente hipertensos (Ofosu-Appiah *et al.*, 1997). Adicionalmente, neutrófilos circulantes podem modular o tônus vascular, uma vez que são capazes também de suprimir a iNOS dependente de IFN-γ em camundongos (Morton *et al.*, 2008). Ademais, já foi demonstrado que doadores de NO inibem a adesão e migração de neutrófilos na vasculatura induzida por estímulo com LPS. Tal efeito se deve a inibição da E-selectina (Kosonen *et al.*, 2000).

Diferentemente dos efeitos observados pela depleção de neutrófilos, a ausência de linfócitos não alterou a expressão de IL-1β. Entretanto, preveniu o aumento de caspase-1 em camundongos RAG1$^{-/-}$ submetidos ao modelo de hipertensão DOCA/sal. De fato, poucos estudos mostram a atividade do NLRP3 em células linfoides. Contudo, o NLRP3 é fundamental para regular a atividade do sistema complemento e linfócitos Th1, afetando diretamente a produção de IFN-γ. Além disso, já foi demonstrado que há ativação do inflamassoma NLRP3 em linfócitos T na circulação periférica de pacientes hipertensos, por meio da ativação de canais para potássio voltagem dependente 1,3 (Zhu *et al.*, 2017). Confirmado que a atividade dos componentes do inflamassoma NLRP3 está correlacionada com a atividade dos linfócitos, decidimos investigar se estes têm alguma função na regulatória na função erétil.

A ausência de linfócitos preveniu o aumento na pressão arterial e endotelial em camundongos submetidos a hipertensão DOCA/sal. Curiosamente, o prejuízo na função erétil não foi completamente prevenido, pois houve melhora somente para o estímulo com menores frequências. Guzik *et al.* (2007) mostraram que a ausência de linfócitos em camundongos RAG1$^{-/-}$ preveniu o aumento da pressão arterial e prejuízo na função vascular promovidas pelo modelo de hipertensão DOCA/sal e/ou por infusão de angiotensina II. Além disso, Guzik *et al.* (2007) mostraram que a reposição de linfócitos T restaura o quadro hipertensivo nestes camundongos, o mesmo não ocorre com a reposição de linfócitos B. Adicionalmente, a deleção do gene RAG1 atenuou a pressão arterial e preveniu o dano renal em ratos Dahl sensíveis a sal (Mattson *et al.*, 2013).

Embora não existam estudos mostrando o papel do infiltrado de neutrófilos ou linfócitos alterando a função do CC, podemos especular que os danos promovidos por estas células do sistema imune no CC ocorre da mesma forma que na vasculatura devido a similaridade entre as estruturas vasculares e o CC.

7. Conclusão:

O NLRP3 constitui-se um mecanismo importante para a gênese da DE, por meio do aumento na liberação de citocinas, recrutamento de neutrófilos e linfócitos Th1, promovidos pela ET-1 no CC

7. Referencias:

ABAIS, J. M. et al. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? **Antioxid Redox Signal,** v. 22, n. 13, p. 1111-29, May 1 2015. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330206 >.

ABRAMS, J. M.; ENGELAND, W. C.; OSBORN, J. W. Effect of intracerebroventricular benzamil on cardiovascular and central autonomic responses to DOCA-salt treatment. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 299, n. 6, p. R1500-10, Dec 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926762 >.

ALLAHDADI, K. J. et al. Endothelin-1 induces contraction of female rat internal pudendal and clitoral arteries through ET(A) receptor and rho-kinase activation. **J Sex Med,** v. 7, n. 6, p. 2096-2103, Jun 2010. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412427 >.

ALONSO, D.; RADOMSKI, M. W. The nitric oxide-endothelin-1 connection. **Heart Fail Rev,** v. 8, n. 1, p. 107-15, Jan 2003. ISSN 1382-4147 (Print)

1382-4147 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12652164 >.

AMIRI, F. et al. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. **Circulation,** v. 110, n. 15, p. 2233-40, Oct 12 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466627 >.

AMMARGUELLAT, F.; LAROUCHE, I.; SCHIFFRIN, E. L. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. **Circulation,** v. 103, n. 2, p. 319-24, Jan 16 2001. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208696 >.

AMMARGUELLAT, F. Z. et al. Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET(A) receptors. **Hypertension,** v. 39, n. 2 Pt 2, p. 679-84, Feb 2002. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882630 >.

ANDERSON, P. G.; BISHOP, S. P.; DIGERNESS, S. B. Coronary vascular function and morphology in hydralazine treated DOCA salt rats. **J Mol Cell Cardiol,** v. 20, n. 10, p. 955-67, Oct 1988. ISSN 0022-2828 (Print)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2975341 >.

ANDERSSON, K. E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacol Rev,** v. 53, n. 3, p. 417-50, Sep 2001. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11546836 >.

ANDERSSON, K. E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiol Rev,** v. 75, n. 1, p. 191-236, Jan 1995. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7831397 >.

ANGGRAHINI, D. W. et al. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. **Cardiovasc Res,** v. 82, n. 1, p. 143-51, Apr 1 2009. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164391 >.

ARANA ROSAINZ MDE, J. et al. Imbalanced low-grade inflammation and endothelial activation in patients with type 2 diabetes mellitus and erectile dysfunction. **J Sex Med,** v. 8, n. 7, p. 2017-30, Jul 2011. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21554550 >.

ARI, G. et al. Possible role for endothelins in penile erection. **Eur J Pharmacol,** v. 307, n. 1, p. 69-74, Jun 20 1996. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8831106 >.

ARONOW, W. S. et al. ACCF/AHA 2011 expert consensus document on hypertension in the elderly: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus documents developed in collaboration with the American Academy of Neurology, American Geriatrics Society, American Society for Preventive Cardiology, American Society of Hypertension, American Society of Nephrology, Association of Black Cardiologists, and European Society of Hypertension. **J Am Coll Cardiol,** v. 57, n. 20, p. 2037-114, May 17 2011. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524875 >.

AYTA, I. A.; MCKINLAY, J. B.; KRANE, R. J. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **BJU Int,** v. 84, n. 1, p. 50-6, Jul 1999. ISSN 1464-4096 (Print)

1464-4096 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444124 >.

BARTON, M.; TRAUPE, T.; HAUDENSCHILD, C. C. Endothelin, hypercholesterolemia and atherosclerosis. **Coron Artery Dis,** v. 14, n. 7, p. 477-90, Nov 2003. ISSN 0954-6928 (Print)

0954-6928 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561940 >.

BATALLER, R. et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. **J Clin Invest,** v. 112, n. 9, p. 1383-94, Nov 2003. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597764 >.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **J Immunol,** v. 183, n. 2, p. 787-91, Jul 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570822 >.

BELLISAI, F. et al. Evaluation of the effect of Bosentan treatment on proinflammatory cytokine serum levels in patients affected by Systemic Sclerosis. **Int J Immunopathol Pharmacol,** v. 24, n. 1, p. 261-4, Jan-Mar 2011. ISSN 0394-6320 (Print)

0394-6320 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21496413 >.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 4, n. 7, p. 517-29, Jul 2003. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838335 >.

BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S.; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis,** v. 170, n. 2, p. 191-203, Oct 2003. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14612198 >.

BLANS, M. C. et al. Infection induced inflammation is associated with erectile dysfunction in men with diabetes. **Eur J Clin Invest,** v. 36, n. 7, p. 497-502, Jul 2006. ISSN 0014-2972 (Print)

0014-2972 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16796607 >.

BORMAN, M. A. et al. Smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase induces Ca2+ sensitization via myosin phosphatase inhibition. **J Biol Chem,** v. 277, n. 26, p. 23441-6, Jun 28 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11976330 >.

BRACKETT, N. L. et al. Treatment of infertility in men with spinal cord injury. **Nat Rev Urol,** v. 7, n. 3, p. 162-72, Mar 2010. ISSN 1759-4820 (Electronic)

1759-4812 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20157304 >.

BROWATZKI, M. et al. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. **Basic Res Cardiol,** v. 95, n. 2, p. 98-105, Apr 2000. ISSN 0300-8428 (Print)

0300-8428 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10826501 >.

BRUDER-NASCIMENTO, T. et al. NLRP3 Inflammasome Mediates Aldosterone-Induced Vascular Damage. **Circulation,** v. 134, n. 23, p. 1866-1880, Dec 6 2016. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27803035 >.

CALLERA, G. E. et al. ETA receptor mediates altered leukocyte-endothelial cell interaction and adhesion molecules expression in DOCA-salt rats. **Hypertension,** v. 43, n. 4, p. 872-9, Apr 2004. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993193 >.

CALLERA, G. E. et al. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. **Clin Sci (Lond),** v. 110, n. 2, p. 243-53, Feb 2006. ISSN 0143-5221 (Print)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271043 >.

CARNEIRO, F. S. et al. DOCA-salt treatment enhances responses to endothelin-1 in murine corpus cavernosum. **Can J Physiol Pharmacol,** v. 86, n. 6, p. 320-8, Jun 2008. ISSN 0008-4212 (Print)

0008-4212 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18516094 >.

CARNEIRO, F. S. et al. Activation of the ET-1/ETA pathway contributes to erectile dysfunction associated with mineralocorticoid hypertension. **J Sex Med,** v. 5, n. 12, p. 2793-807, Dec 2008. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18823320 >.

CARNEIRO, F. S.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. Emerging role for TNF-alpha in erectile dysfunction. **J Sex Med,** v. 7, n. 12, p. 3823-34, Dec 2010. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20345734 >.

CARNEIRO, F. S. et al. TNF-alpha infusion impairs corpora cavernosa reactivity. **J Sex Med,** v. 6 Suppl 3, p. 311-9, Mar 2009. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19267854 >.

CARSON, C. C., 3RD. Vascular risk factors for erectile dysfunction. **J Urol,** v. 178, n. 6, p. 2250-1, Dec 2007. ISSN 1527-3792 (Electronic)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936810 >.

CHANG, S. T. et al. Prevalence and cardiovascular disease risk differences for erectile dysfunction patients by three metabolic syndrome definitions. **Int J Impot Res,** v. 23, n. 2, p. 87-93, Mar-Apr 2011. ISSN 1476-5489 (Electronic)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21471983 >.

CHATTERJEE, M. et al. Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),** v. 53, n. 1, p. 84-93, Apr 15 2007. ISSN 1165-158X (Electronic)

0145-5680 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17519116 >.

CHEN, W. et al. Activation of the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: a novel inhibitory effect of minocycline. **Inflamm Res,** v. 66, n. 2, p. 157-166, Feb 2017. ISSN 1420-908X (Electronic)

1023-3830 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27785530 >.

CHEN, Y. et al. Endothelin-1 receptor antagonists prevent the development of pulmonary emphysema in rats. **Eur Respir J,** v. 35, n. 4, p. 904-12, Apr 2010. ISSN 1399-3003 (Electronic)

0903-1936 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19897563 >.

CHESTER, A. H. et al. Influence of endothelin on human coronary arteries and localization of its binding sites. **Am J Cardiol,** v. 63, n. 18, p. 1395-8, Jun 1 1989. ISSN 0002-9149 (Print)

0002-9149 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2658527 >.

CHITALEY, K. et al. Decreased penile erection in DOCA-salt and stroke prone-spontaneously hypertensive rats. **Int J Impot Res,** v. 13 Suppl 5, p. S16-20, Dec 2001. ISSN 0955-9930 (Print)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781742 >.

CHITALEY, K. et al. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. **Nat Med,** v. 7, n. 1, p. 119-22, Jan 2001. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11135626 >.

CIRINO, G. et al. Pharmacology of erectile dysfunction in man. **Pharmacol Ther,** v. 111, n. 2, p. 400-23, Aug 2006. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443277 >.

CLARKE, J. G. et al. Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men. **Am J Physiol,** v. 257, n. 6 Pt 2, p. H2033-5, Dec 1989. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2690644 >.

CLERK, A.; SUGDEN, P. H. Regulation of phospholipases C and D in rat ventricular myocytes: stimulation by endothelin-1, bradykinin and phenylephrine. **J Mol Cell Cardiol,** v. 29, n. 6, p. 1593-604, Jun 1997. ISSN 0022-2828 (Print)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9220345 >.

CRUVINEL WDE, M. et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev Bras Reumatol,** v. 50, n. 4, p. 434-61, Jul-Aug 2010. ISSN 1809-4570 (Electronic)

0482-5004 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21125178 >.

DAIL, W. G. et al. Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. **Cell Tissue Res,** v. 282, n. 1, p. 109-16, Oct 1995. ISSN 0302-766X (Print)

0302-766X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581913 >.

DASHWOOD, M. R.; TSUI, J. C. Further evidence for a role of endothelin-1 (ET-1) in critical limb ischaemia. **J Cell Commun Signal,** v. 5, n. 1, p. 45-9, Mar 2011. ISSN 1873-961X (Electronic)

1873-9601 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21484588 >.

DAY, R.; LARIVIERE, R.; SCHIFFRIN, E. L. In situ hybridization shows increased endothelin-1 mRNA levels in endothelial cells of blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Am J Hypertens,** v. 8, n. 3, p. 294-300, Mar 1995. ISSN 0895-7061 (Print)

0895-7061 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7794580 >.

DEAN, R. C.; LUE, T. F. Neuroregenerative strategies after radical prostatectomy. **Rev Urol,** v. 7 Suppl 2, p. S26-32, 2005. ISSN 1523-6161 (Print)

1523-6161 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985894 >.

DENG, L. Y.; SCHIFFRIN, E. L. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. **Am J Physiol,** v. 262, n. 6 Pt 2, p. H1782-7, Jun 1992. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1621836 >.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol,** v. 27, p. 519-50, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302047 >.

DOI, T. et al. Aldosterone induces interleukin-18 through endothelin-1, angiotensin II, Rho/Rho-kinase, and PPARs in cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 295, n. 3, p. H1279-H1287, Sep 2008. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18660453 >.

DONATE, P. B. et al. Bosentan, an endothelin receptor antagonist, ameliorates collagen-induced arthritis: the role of TNF-alpha in the induction of endothelin system genes. **Inflamm Res,** v. 61, n. 4, p. 337-48, Apr 2012. ISSN 1420-908X (Electronic)

1023-3830 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22249931 >.

EARDLEY, I.; SETHIA, K. Erectile dysfunction : current investigation and management. **London: Mosby 2nd ed**, 2003.

ELMARAKBY, A. A. et al. TNF-alpha inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 294, n. 1, p. R76-83, Jan 2008. ISSN 0363-6119 (Print)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17989143 >.

EMORI, T. et al. Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. **Biochem Pharmacol,** v. 44, n. 12, p. 2409-11, Dec 15 1992. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1472106 >.

ESPOSITO, K. et al. Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. **JAMA,** v. 291, n. 24, p. 2978-84, Jun 23 2004. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15213209 >.

FABRICIO, A. S. et al. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. **Br J Pharmacol,** v. 125, n. 3, p. 542-8, Oct 1998. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9806338 >.

FABRICIO, A. S. et al. Interleukin-1 mediates endothelin-1-induced fever and prostaglandin production in the preoptic area of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 290, n. 6, p. R1515-23, Jun 2006. ISSN 0363-6119 (Print)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455768 >.

FAIS, R. S. et al. The inflammasome NLRP3 plays a dual role on mouse corpora cavernosa relaxation. **Sci Rep,** v. 9, n. 1, p. 16224, Nov 7 2019. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31700106 >.

FELDMAN, H. A. et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. **J Urol,** v. 151, n. 1, p. 54-61, Jan 1994. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254833 >.

FELDMAN, H. A. et al. Erectile dysfunction and coronary risk factors: prospective results from the Massachusetts male aging study. **Prev Med,** v. 30, n. 4, p. 328-38, Apr 2000. ISSN 0091-7435 (Print)

0091-7435 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731462 >.

FILIPPI, S. et al. Studies on the mechanisms involved in the ATP-induced relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. **J Urol,** v. 161, n. 1, p. 326-31, Jan 1999. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037432 >.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res,** v. 43, n. 3, p. 532-41, Aug 15 1999. ISSN 0008-6363 (Print)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690325 >.

FOLDES, G. et al. Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells. **PLoS One,** v. 5, n. 5, p. e10501, May 05 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463927 >.

FORD, R. L. et al. Endothelin-A receptor inhibition after cardiopulmonary bypass: cytokines and receptor activation. **Ann Thorac Surg,** v. 86, n. 5, p. 1576-83, Nov 2008. ISSN 1552-6259 (Electronic)

0003-4975 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19049753 >.

FRANCAVILLA, S. et al. Endothelin-1 in diabetic and nondiabetic men with erectile dysfunction. **J Urol,** v. 158, n. 5, p. 1770-4, Nov 1997. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334598 >.

FRANCHI, L. et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nat Immunol,** v. 10, n. 3, p. 241-7, Mar 2009. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19221555 >.

FUNDER, J.; NEW, M. I. Low renin hypertension (LRH): shades of John Laragh. **Trends Endocrinol Metab,** v. 19, n. 3, p. 83, Apr 2008. ISSN 1043-2760 (Print)

1043-2760 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353670 >.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature,** v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253831 >.

GALLE, J. et al. CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O(2)(-) formation. **Nephrol Dial Transplant,** v. 15, n. 3, p. 339-46, Mar 2000. ISSN 0931-0509 (Print)

0931-0509 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692519 >.

GANDAGLIA, G. et al. A systematic review of the association between erectile dysfunction and cardiovascular disease. **Eur Urol,** v. 65, n. 5, p. 968-78, May 2014. ISSN 1873-7560 (Electronic)

0302-2838 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011423 >.

GOMEZ-GUZMAN, M. et al. Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. **Free Radic Biol Med,** v. 52, n. 1, p. 70-9, Jan 1 2012. ISSN 1873-4596 (Electronic)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001745 >.

GONON, A. T. et al. Limitation of infarct size and attenuation of myeloperoxidase activity by an endothelin A receptor antagonist following ischaemia and reperfusion. **Basic Res Cardiol,** v. 96, n. 5, p. 454-62, Sep 2001. ISSN 0300-8428 (Print)

0300-8428 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11605992 >.

GRANCHI, S. et al. Expression and regulation of endothelin-1 and its receptors in human penile smooth muscle cells. **Mol Hum Reprod,** v. 8, n. 12, p. 1053-64, Dec 2002. ISSN 1360-9947 (Print)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12468637 >.

GRATZKE, C. et al. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. **J Sex Med,** v. 7, n. 1 Pt 2, p. 445-75, Jan 2010. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20092448 >.

GROBE, J. L. et al. Angiotensinergic signaling in the brain mediates metabolic effects of deoxycorticosterone (DOCA)-salt in C57 mice. **Hypertension,** v. 57, n. 3, p. 600-7, Mar 2011. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21263123 >.

GUMA, M. et al. Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. **Arthritis Rheum,** v. 60, n. 12, p. 3642-50, Dec 2009. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19950258 >.

GUZIK, T. J. et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. **J Exp Med,** v. 204, n. 10, p. 2449-60, Oct 1 2007. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875676 >.

HANSEN, P. R. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. **Circulation,** v. 91, n. 6, p. 1872-85, Mar 15 1995. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7882499 >.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol,** v. 6, n. 11, p. 1123-32, Nov 2005. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200070 >.

HARRISON, D. G. et al. Inflammation, immunity, and hypertension. **Hypertension,** v. 57, n. 2, p. 132-40, Feb 2011. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149826 >.

HAUG, C. et al. Increased endothelin release by cultured human smooth muscle cells from atherosclerotic coronary arteries. **Cardiovasc Res,** v. 31, n. 5, p. 807-13, May 1996. ISSN 0008-6363 (Print)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8763411 >.

HAYNES, W. G.; WEBB, D. J. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. **Lancet,** v. 344, n. 8926, p. 852-4, Sep 24 1994. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7916401 >.

_____. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. **J Hypertens,** v. 16, n. 8, p. 1081-98, Aug 1998. ISSN 0263-6352 (Print)

0263-6352 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794709 >.

HELSET, E. et al. Endothelin-1 stimulates human monocytes in vitro to release TNF-alpha , IL-1beta and IL-6. **Mediators Inflamm,** v. 2, n. 6, p. 417-22, 1993. ISSN 0962-9351 (Print)

0962-9351 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18475557 >.

HERRERA, M. et al. Endothelin-1 inhibits thick ascending limb transport via Akt-stimulated nitric oxide production. **J Biol Chem,** v. 284, n. 3, p. 1454-60, Jan 16 2009. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033447 >.

HICKEY, K. A. et al. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. **Am J Physiol,** v. 248, n. 5 Pt 1, p. C550-6, May 1985. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3993773 >.

HOFFMAN, H. M.; BRYDGES, S. D. Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease. **J Biol Chem,** v. 286, n. 13, p. 10889-96, Apr 1 2011. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296874 >.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat Immunol,** v. 9, n. 8, p. 847-56, Aug 2008. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604214 >.

HSU, L. C. et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 105, n. 22, p. 7803-8, Jun 3 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511561 >.

HUGHES, A. K. et al. Effect of reactive oxygen species on endothelin-1 production by human mesangial cells. **Kidney Int,** v. 49, n. 1, p. 181-9, Jan 1996. ISSN 0085-2538 (Print)

0085-2538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770966 >.

IMAI, Y. et al. Interaction between cytokines and inflammatory cells in islet dysfunction, insulin resistance and vascular disease. **Diabetes Obes Metab,** v. 15 Suppl 3, p. 117-29, Sep 2013. ISSN 1463-1326 (Electronic)

1462-8902 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24003928 >.

INOHARA, N. et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. **J Biol Chem,** v. 274, n. 21, p. 14560-7, May 21 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329646 >.

INOUE, A. et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 86, n. 8, p. 2863-7, Apr 1989. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649896 >.

INOUE, Y. et al. NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. **J Immunol,** v. 192, n. 9, p. 4342-51, May 1 2014. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696236 >.

IWASA, S. et al. Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis. **Atherosclerosis,** v. 146, n. 1, p. 93-100, Sep 1999. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10487491 >.

IYER, A.; CHAN, V.; BROWN, L. The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress. **Curr Cardiol Rev,** v. 6, n. 4, p. 291-7, Nov 2010. ISSN 1875-6557 (Electronic)

1573-403X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22043205 >.

JACKSON, M. H. et al. Neutrophil count and activation in vascular disease. **Scott Med J,** v. 37, n. 2, p. 41-3, Apr 1992. ISSN 0036-9330 (Print)

0036-9330 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1609264 >.

JIN, C.; FLAVELL, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **J Clin Immunol,** v. 30, n. 5, p. 628-31, Sep 2010. ISSN 1573-2592 (Electronic)

0271-9142 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20589420 >.

JIN, L. et al. NADPH oxidase activation: a mechanism of hypertension-associated erectile dysfunction. **J Sex Med,** v. 5, n. 3, p. 544-51, Mar 2008. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18208505 >.

KARAM, H. et al. Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. Comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism. **Hypertension,** v. 28, n. 3, p. 379-85, Sep 1996. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8794820 >.

KAWAGUCHI, M. et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. **Circulation,** v. 123, n. 6, p. 594-604, Feb 15 2011. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282498 >.

KEARNEY, P. M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet,** v. 365, n. 9455, p. 217-23, Jan 15-21 2005. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652604 >.

KEDZIERSKI, R. M.; YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** v. 41, p. 851-76, 2001. ISSN 0362-1642 (Print)

0362-1642 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264479 >.

KEENE, L. C.; DAVIES, P. H. Drug-related erectile dysfunction. **Adverse Drug React Toxicol Rev,** v. 18, n. 1, p. 5-24, Mar 1999. ISSN 0964-198X (Print)

0964-198X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401520 >.

KENDIRCI, M. et al. Peripheral mechanisms of erectile dysfunction in a rat model of chronic cocaine use. **Eur Urol,** v. 52, n. 2, p. 555-63, Aug 2007. ISSN 0302-2838 (Print)

0302-2838 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17420087 >.

KIRBY, M. et al. Is erectile dysfunction a marker for cardiovascular disease? **Int J Clin Pract,** v. 55, n. 9, p. 614-8, Nov 2001. ISSN 1368-5031 (Print)

1368-5031 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11770359 >.

KLANKE, B. et al. Blood pressure versus direct mineralocorticoid effects on kidney inflammation and fibrosis in DOCA-salt hypertension. **Nephrol Dial Transplant,** v. 23, n. 11, p. 3456-63, Nov 2008. ISSN 1460-2385 (Electronic)

0931-0509 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515791 >.

KLENIEWSKA, P. et al. Influence of block of NF-kappa B signaling pathway on oxidative stress in the liver homogenates. **Oxid Med Cell Longev,** v. 2013, p. 308358, 2013. ISSN 1942-0994 (Electronic)

1942-0994 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23577221 >.

KOHAN, D. E.; BARTON, M. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. **Kidney Int,** v. 86, n. 5, p. 896-904, Nov 2014. ISSN 1523-1755 (Electronic)

0085-2538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24805108 >.

KOMADA, T. et al. ASC in renal collecting duct epithelial cells contributes to inflammation and injury after unilateral ureteral obstruction. **Am J Pathol,** v. 184, n. 5, p. 1287-98, May 2014. ISSN 1525-2191 (Electronic)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24606883 >.

KOSONEN, O. et al. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in and neutrophil adhesion to human endothelial cells. **Eur J Pharmacol,** v. 394, n. 1, p. 149-56, Apr 7 2000. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10771047 >.

KOWALCZYK, A. et al. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz),** v. 63, n. 1, p. 41-52, Feb 2015. ISSN 1661-4917 (Electronic)

0004-069X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288367 >.

KRISHNAN, S. M. et al. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. **Br J Pharmacol,** v. 173, n. 4, p. 752-65, Feb 2016. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26103560 >.

KRISHNAN, S. M. et al. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. **Cardiovasc Res,** v. 115, n. 4, p. 776-787, Mar 15 2019. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30357309 >.

KRISTAL, B. et al. Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. **Am J Hypertens,** v. 11, n. 8 Pt 1, p. 921-8, Aug 1998. ISSN 0895-7061 (Print)

0895-7061 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9715783 >.

LARIVIERE, R.; DAY, R.; SCHIFFRIN, E. L. Increased expression of endothelin-1 gene in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Hypertension,** v. 21, n. 6 Pt 2, p. 916-20, Jun 1993. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8505101 >.

LARIVIERE, R. et al. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. **J Mol Cell Cardiol,** v. 27, n. 10, p. 2123-31, Oct 1995. ISSN 0022-2828 (Print)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576929 >.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol,** v. 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23702978 >.

LEITE, R. et al. Targets for the treatment of erectile dysfunction: is NO/cGMP still the answer? **Recent Pat Cardiovasc Drug Discov,** v. 2, n. 2, p. 119-32, Jun 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18221110 >.

LEWINGTON, S. et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet,** v. 360, n. 9349, p. 1903-13, Dec 14 2002. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493255 >.

LI, J. S.; LARIVIERE, R.; SCHIFFRIN, E. L. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. **Hypertension,** v. 24, n. 2, p. 183-8, Aug 1994. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8039842 >.

LI, L. et al. Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. **Hypertension,** v. 42, n. 5, p. 997-1003, Nov 2003. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517226 >.

LI, L. et al. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced venoconstriction in mineralocorticoid hypertension. **Hypertension,** v. 42, n. 3, p. 316-21, Sep 2003. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12885792 >.

LI, Y.; LEVESQUE, L. O.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 299, n. 6, p. H1959-67, Dec 2010. ISSN 1522-1539 (Electronic)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20852045 >.

LIANG, L. et al. Endothelin-1 stimulates proinflammatory cytokine expression in human periodontal ligament cells via mitogen-activated protein kinase pathway. **J Periodontol,** v. 85, n. 4, p. 618-26, Apr 2014. ISSN 1943-3670 (Electronic)

0022-3492 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701479 >.

LIM, S. S. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet,** v. 380, n. 9859, p. 2224-60, Dec 15 2012. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245609 >.

LOCH, D. et al. Rosuvastatin attenuates hypertension-induced cardiovascular remodeling without affecting blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats. **J Cardiovasc Pharmacol,** v. 47, n. 3, p. 396-404, Mar 2006. ISSN 0160-2446 (Print)

0160-2446 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633082 >.

LUE, T. F. Erectile dysfunction. **N Engl J Med,** v. 342, n. 24, p. 1802-13, Jun 15 2000. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10853004 >.

LUSCHER, T. F.; BARTON, M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. **Circulation,** v. 102, n. 19, p. 2434-40, Nov 7 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11067800 >.

MACARTHUR, H. et al. Endothelin-1 release from endothelial cells in culture is elevated both acutely and chronically by short periods of mechanical stretch. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 200, n. 1, p. 395-400, Apr 15 1994. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8166711 >.

MADHUR, M. S. et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. **Hypertension,** v. 55, n. 2, p. 500-7, Feb 2010. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20038749 >.

MAEKAWA, M. et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. **Science,** v. 285, n. 5429, p. 895-8, Aug 6 1999. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436159 >.

MALACHIAS, M. et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 1 - Concept, Epidemiology and Primary Prevention. **Arq Bras Cardiol,** v. 107, n. 3 Suppl 3, p. 1-6, Sep 2016. ISSN 1678-4170 (Electronic)

0066-782X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27819380 >.

MALEK, A. M. et al. Endothelin-1 gene suppression by shear stress: pharmacological evaluation of the role of tyrosine kinase, intracellular calcium, cytoskeleton, and mechanosensitive channels. **J Mol Cell Cardiol,** v. 31, n. 2, p. 387-99, Feb 1999. ISSN 0022-2828 (Print)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10093051 >.

MANN, D. L. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. **Circ Res,** v. 108, n. 9, p. 1133-45, Apr 29 2011. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527743 >.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nat Rev Immunol,** v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2007. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186029 >.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol,** v. 27, p. 229-65, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302040 >.

MARVAR, P. J.; GORDON, F. J.; HARRISON, D. G. Blood pressure control: salt gets under your skin. **Nat Med,** v. 15, n. 5, p. 487-8, May 2009. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19424204 >.

MARVAR, P. J. et al. T lymphocytes and vascular inflammation contribute to stress-dependent hypertension. **Biol Psychiatry,** v. 71, n. 9, p. 774-82, May 1 2012. ISSN 1873-2402 (Electronic)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22361077 >.

MATTSON, D. L. et al. Genetic mutation of recombination activating gene 1 in Dahl salt-sensitive rats attenuates hypertension and renal damage. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 304, n. 6, p. R407-14, Mar 15 2013. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23364523 >.

MCFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **Br J Pharmacol,** v. 135, n. 1, p. 1-13, Jan 2002. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11786473 >.

MESSERLI, F. H.; WILLIAMS, B.; RITZ, E. Essential hypertension. **Lancet,** v. 370, n. 9587, p. 591-603, Aug 18 2007. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707755 >.

MIRKOVIC, S. et al. Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats. **Br J Pharmacol,** v. 135, n. 4, p. 961-8, Feb 2002. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861324 >.

MOLET, S. et al. Chemokine- and cytokine-induced expression of endothelin 1 and endothelin-converting enzyme 1 in endothelial cells. **J Allergy Clin Immunol,** v. 105, n. 2 Pt 1, p. 333-8, Feb 2000. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669855 >.

MORELAND, R. B. et al. The biochemical and neurologic basis for the treatment of male erectile dysfunction. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 296, n. 2, p. 225-34, Feb 2001. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160602 >.

MORTON, J. et al. Circulating neutrophils maintain physiological blood pressure by suppressing bacteria and IFNgamma-dependent iNOS expression in the vasculature of healthy mice. **Blood,** v. 111, n. 10, p. 5187-94, May 15 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281503 >.

MULLER, A.; MULHALL, J. P. Cardiovascular disease, metabolic syndrome and erectile dysfunction. **Curr Opin Urol,** v. 16, n. 6, p. 435-43, Nov 2006. ISSN 0963-0643 (Print)

0963-0643 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053524 >.

MULLER, D. N.; KVAKAN, H.; LUFT, F. C. Immune-related effects in hypertension and target-organ damage. **Curr Opin Nephrol Hypertens,** v. 20, n. 2, p. 113-7, Mar 2011. ISSN 1473-6543 (Electronic)

1062-4821 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245763 >.

MUMTAZ, F. H. et al. Pharmacological properties of endothelin-1 in the rabbit corpus cavernosum. **In Vivo,** v. 20, n. 2, p. 243-6, Mar-Apr 2006. ISSN 0258-851X (Print)

0258-851X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16634525 >.

MUNIZ, J. J. et al. Chronic ethanol consumption induces erectile dysfunction: Role of oxidative stress. **Life Sci,** v. 141, p. 44-53, Nov 15 2015. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26407475 >.

MURANYI, A. et al. Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. **Biochem J,** v. 366, n. Pt 1, p. 211-6, Aug 15 2002. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12030846 >.

NAKA, T. et al. Mechanical stretch induced interleukin-18 (IL-18) expression through Angiotensin subtype 1 receptor (AT1R) and endothelin-1 in cardiomyocytes. **Prep Biochem Biotechnol,** v. 38, n. 2, p. 201-12, 2008. ISSN 1532-2297 (Electronic)

1082-6068 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18320471 >.

NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu Rev Immunol,** v. 19, p. 423-74, 2001. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244043 >.

NELSON, J. et al. The endothelin axis: emerging role in cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 3, n. 2, p. 110-6, Feb 2003. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563310 >.

NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. **JAMA,** v. 270, n. 1, p. 83-90, Jul 7 1993. ISSN 0098-7484 (Print)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8510302 >.

O'BRIEN, D. et al. L-carnitine attenuates cardiac remodelling rather than vascular remodelling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol,** v. 106, n. 4, p. 296-301, Apr 2010. ISSN 1742-7843 (Electronic)

1742-7835 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20041879 >.

OFOSU-APPIAH, W. et al. Neutrophil-mediated damage to vascular endothelium in the spontaneously hypertensive rat. **Clin Immunol Immunopathol,** v. 83, n. 3, p. 293-301, Jun 1997. ISSN 0090-1229 (Print)

0090-1229 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175919 >.

OKTAR, B. K. et al. Endothelin-1-induced PMN infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,** v. 279, n. 3, p. G483-91, Sep 2000. ISSN 0193-1857 (Print)

0193-1857 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960346 >.

ORTMANN, J. et al. Endothelin inhibition delays onset of hyperglycemia and associated vascular injury in type I diabetes: evidence for endothelin release by pancreatic islet beta-cells. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 334, n. 2, p. 689-95, Aug 26 2005. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009335 >.

OZDEMIR, R. et al. Selective endothelin a (ETA) receptor antagonist (BQ-123) reduces both myocardial infarct size and oxidant injury. **Toxicology,** v. 219, n. 1-3, p. 142-9, Feb 15 2006. ISSN 0300-483X (Print)

0300-483X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406210 >.

PARISSIS, J. T. et al. Plasma profiles of peripheral monocyte-related inflammatory markers in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. **Int J Cardiol,** v. 83, n. 1, p. 13-21, Apr 2002. ISSN 0167-5273 (Print)

0167-5273 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11959378 >.

PARKKISENNIEMI, U. M.; KLINGE, E. Functional characterization of endothelin receptors in the bovine retractor penis muscle and penile artery. **Pharmacol Toxicol,** v. 79, n. 2, p. 73-9, Aug 1996. ISSN 0901-9928 (Print)

0901-9928 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8878249 >.

PEDRA, J. H.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. **Curr Opin Immunol,** v. 21, n. 1, p. 10-6, Feb 2009. ISSN 1879-0372 (Electronic)

0952-7915 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223160 >.

PETRILLI, 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 (Print)

1350-9047 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599094 >.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nat Med,** v. 17, n. 11, p. 1381-90, Nov 7 2011. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064428 >.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; KLENIEWSKA, P.; GORACA, A. The influence of ETA and ETB receptor blockers on LPS-induced oxidative stress and NF-kappaB signaling pathway in heart. **Gen Physiol Biophys,** v. 31, n. 3, p. 271-8, Sep 2012. ISSN 0231-5882 (Print)

0231-5882 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23047940 >.

PIECHOTA, A.; GORACA, A. Influence of nuclear factor-kappaB inhibition on endothelin-1 induced lung edema and oxidative stress in rats. **J Physiol Pharmacol,** v. 62, n. 2, p. 183-8, Apr 2011. ISSN 1899-1505 (Electronic)

0867-5910 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673366 >.

POCH, E. et al. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. **Hypertension,** v. 38, n. 5, p. 1204-9, Nov 2001. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711524 >.

PRIETO, D. et al. Ca2+-activated K+ (KCa) channels are involved in the relaxations elicited by sildenafil in penile resistance arteries. **Eur J Pharmacol,** v. 531, n. 1-3, p. 232-7, Feb 15 2006. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443214 >.

PRINS, B. A. et al. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. **J Biol Chem,** v. 269, n. 16, p. 11938-44, Apr 22 1994. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8163494 >.

PRIVIERO, F. B. et al. Neurophysiological basis of penile erection. **Acta Pharmacol Sin,** v. 28, n. 6, p. 751-5, Jun 2007. ISSN 1671-4083 (Print)

1671-4083 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506932 >.

RATHINAM, V. A.; VANAJA, S. K.; FITZGERALD, K. A. Regulation of inflammasome signaling. **Nat Immunol,** v. 13, n. 4, p. 333-42, Mar 19 2012. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430786 >.

REDMOND, E. M. et al. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Cell Physiol,** v. 166, n. 3, p. 469-79, Mar 1996. ISSN 0021-9541 (Print)

0021-9541 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600150 >.

REN, X. S. et al. NLRP3 Gene Deletion Attenuates Angiotensin II-Induced Phenotypic Transformation of Vascular Smooth Muscle Cells and Vascular Remodeling. **Cell Physiol Biochem,** v. 44, n. 6, p. 2269-2280, 2017. ISSN 1421-9778 (Electronic)

1015-8987 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262411 >.

RITCHIE, R.; SULLIVAN, M. Endothelins & erectile dysfunction. **Pharmacol Res,** v. 63, n. 6, p. 496-501, Jun 2011. ISSN 1096-1186 (Electronic)

1043-6618 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21185376 >.

RODRIGUES, F. L. et al. There is a link between erectile dysfunction and heart failure: it could be inflammation. **Curr Drug Targets,** v. 16, n. 5, p. 442-50, 2015. ISSN 1873-5592 (Electronic)

1389-4501 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25892310 >.

RUSSELL, F. D.; DAVENPORT, A. P. Secretory pathways in endothelin synthesis. **Br J Pharmacol,** v. 126, n. 2, p. 391-8, Jan 1999. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077230 >.

SAENZ DE TEJADA, I. et al. Physiology of erectile function. **J Sex Med,** v. 1, n. 3, p. 254-65, Nov 2004. ISSN 1743-6095 (Print)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16422955 >.

SANCHEZ, A. et al. Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin-resistant obese rats: role of ET(A) and ET(B) receptors. **Br J Pharmacol,** v. 171, n. 24, p. 5682-95, Dec 2014. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091502 >.

SCHLOSSMANN, J.; FEIL, R.; HOFMANN, F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. **Ann Med,** v. 35, n. 1, p. 21-7, 2003. ISSN 0785-3890 (Print)

0785-3890 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12693609 >.

SCHULTZ, K. et al. Endogenous interleukin-1 alpha promotes a proliferative and proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 292, n. 6, p. H2927-34, Jun 2007. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293495 >.

SEFTEL, A. D. Phosphodiesterase type 5 inhibitors: molecular pharmacology and interactions with other phosphodiesterases. **Curr Pharm Des,** v. 11, n. 31, p. 4047-58, 2005. ISSN 1381-6128 (Print)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16378510 >.

SHABSIGH, R. et al. Drivers and barriers to seeking treatment for erectile dysfunction: a comparison of six countries. **BJU Int,** v. 94, n. 7, p. 1055-65, Nov 2004. ISSN 1464-4096 (Print)

1464-4096 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541128 >.

SHABSIGH, R. et al. Health issues of men: prevalence and correlates of erectile dysfunction. **J Urol,** v. 174, n. 2, p. 662-7, Aug 2005. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006943 >.

SHABSIGH, R.; SHAH, M.; SAND, M. Erectile dysfunction and men's health: developing a comorbidity risk calculator. **J Sex Med,** v. 5, n. 5, p. 1237-1243, May 2008. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439154 >.

SHAO, W. et al. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. **J Biol Chem,** v. 282, n. 50, p. 36321-9, Dec 14 2007. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959595 >.

SIMONSEN, U.; GARCIA-SACRISTAN, A.; PRIETO, D. Penile arteries and erection. **J Vasc Res,** v. 39, n. 4, p. 283-303, Jul-Aug 2002. ISSN 1018-1172 (Print)

1018-1172 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12187119 >.

SIMONSON, M. S.; DUNN, M. J. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. **FASEB J,** v. 4, n. 12, p. 2989-3000, Sep 1990. ISSN 0892-6638 (Print)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2168326 >.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat Rev Immunol,** v. 10, n. 2, p. 89-102, Feb 2010. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081871 >.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **J Physiol,** v. 522 Pt 2, p. 177-85, Jan 15 2000. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639096 >.

SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochem Pharmacol,** v. 78, n. 6, p. 539-52, Sep 15 2009. ISSN 1873-2968 (Electronic)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19413999 >.

STALLMANN-JORGENSEN, I. et al. A Toll-Like Receptor 1/2 Agonist Augments Contractility in Rat Corpus Cavernosum. **J Sex Med,** v. 12, n. 8, p. 1722-31, Aug 2015. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26234560 >.

SUZUKI, S. et al. Endothelin-1-induced prostaglandin E2 production: modulation of contractile response to endothelin-1 in porcine coronary artery. **Eur J Pharmacol,** v. 217, n. 1, p. 97-100, Jun 24 1992. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1397025 >.

TANGI, T. N. et al. Role of NLRP3 and CARD8 in the regulation of TNF-alpha induced IL-1beta release in vascular smooth muscle cells. **Int J Mol Med,** v. 30, n. 3, p. 697-702, Sep 2012. ISSN 1791-244X (Electronic)

1107-3756 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711073 >.

TONARI, M. et al. Blocking endothelin-B receptors rescues retinal ganglion cells from optic nerve injury through suppression of neuroinflammation. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** v. 53, n. 7, p. 3490-500, Jun 8 2012. ISSN 1552-5783 (Electronic)

0146-0404 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22562513 >.

TOSTES, R. C. et al. Determination of adenosine effects and adenosine receptors in murine corpus cavernosum. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 322, n. 2, p. 678-85, Aug 2007. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494861 >.

TOUSOULIS, D. et al. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. **Atherosclerosis,** v. 201, n. 2, p. 236-47, Dec 2008. ISSN 1879-1484 (Electronic)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599065 >.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat Rev Immunol,** v. 7, n. 3, p. 179-90, Mar 2007. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17318230 >.

VADDI, K.; NEWTON, R. C. Comparison of biological responses of human monocytes and THP-1 cells to chemokines of the intercrine-beta family. **J Leukoc Biol,** v. 55, n. 6, p. 756-62, Jun 1994. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7515094 >.

VAN MOURIK, J. A.; ROMANI DE WIT, T.; VOORBERG, J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. **Histochem Cell Biol,** v. 117, n. 2, p. 113-22, Feb 2002. ISSN 0948-6143 (Print)

0948-6143 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11935287 >.

VIEL, E. C. et al. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 295, n. 1, p. H281-8, Jul 2008. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18487445 >.

VILAYSANE, A. et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. **J Am Soc Nephrol,** v. 21, n. 10, p. 1732-44, Oct 2010. ISSN 1533-3450 (Electronic)

1046-6673 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20688930 >.

VIRDIS, A.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? **Curr Opin Nephrol Hypertens,** v. 12, n. 2, p. 181-7, Mar 2003. ISSN 1062-4821 (Print)

1062-4821 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12589179 >.

WAGNER, O. F. et al. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. **J Biol Chem,** v. 267, n. 23, p. 16066-8, Aug 15 1992. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644793 >.

WAN, Z. et al. NLRP3 inflammasome promotes diabetes-induced endothelial inflammation and atherosclerosis. **Diabetes Metab Syndr Obes,** v. 12, p. 1931-1942, 2019. ISSN 1178-7007 (Print)

1178-7007 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31571967 >.

WARD, R.; ERGUL, A. Relationship of endothelin-1 and NLRP3 inflammasome activation in HT22 hippocampal cells in diabetes. **Life Sci,** v. 159, p. 97-103, Aug 15 2016. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26883974 >.

WARNATSCH, A. et al. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. **Science,** v. 349, n. 6245, p. 316-20, Jul 17 2015. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185250 >.

WEINBERGER, M. H. et al. Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance. **Hypertension,** v. 8, n. 6 Pt 2, p. II127-34, Jun 1986. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3522418 >.

WESTERTERP, M. et al. Cholesterol Efflux Pathways Suppress Inflammasome Activation, NETosis, and Atherogenesis. **Circulation,** v. 138, n. 9, p. 898-912, Aug 28 2018. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29588315 >.

WINGARD, C. J. et al. RhoA-Rho kinase mediates synergistic ET-1 and phenylephrine contraction of rat corpus cavernosum. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 285, n. 5, p. R1145-52, Nov 2003. ISSN 0363-6119 (Print)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12893655 >.

XIA, H. et al. Brain angiotensin-converting enzyme type 2 shedding contributes to the development of neurogenic hypertension. **Circ Res,** v. 113, n. 9, p. 1087-1096, Oct 12 2013. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24014829 >.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature,** v. 332, n. 6163, p. 411-5, Mar 31 1988. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2451132 >.

YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. **Trends Pharmacol Sci,** v. 10, n. 9, p. 374-8, Sep 1989. ISSN 0165-6147 (Print)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2690429 >.

YANG, D. et al. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. **Exp Eye Res,** v. 85, n. 4, p. 462-72, Oct 2007. ISSN 0014-4835 (Print)

0014-4835 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765224 >.

YEAGER, M. E. et al. Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: role of pulmonary artery smooth muscle cells. **Am J Respir Cell Mol Biol,** v. 46, n. 1, p. 14-22, Jan 2012. ISSN 1535-4989 (Electronic)

1044-1549 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778413 >.

YIN, Y. et al. Inflammasomes: sensors of metabolic stresses for vascular inflammation. **Front Biosci (Landmark Ed),** v. 18, p. 638-49, Jan 1 2013. ISSN 1093-4715 (Electronic)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23276949 >.

YOSHITOMI, Y. et al. Acute renal failure in accidental hypothermia of cold water immersion. **Am J Kidney Dis,** v. 31, n. 5, p. 856-9, May 1998. ISSN 1523-6838 (Electronic)

0272-6386 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590198 >.

ZHU, J. et al. T-lymphocyte Kv1.3 channel activation triggers the NLRP3 inflammasome signaling pathway in hypertensive patients. **Exp Ther Med,** v. 14, n. 1, p. 147-154, Jul 2017. ISSN 1792-0981 (Print)

1792-0981 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28672906 >.

ZICHA, J. et al. Antidiuretic and pressor actions of vasopressin in age-dependent DOCA-salt hypertension. **Am J Physiol,** v. 256, n. 1 Pt 2, p. R138-45, Jan 1989. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2912206 >.

8. Anexos.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado *"Papel do NLRP3 na disfunção erétil em modelo de hipertensão DOCA/sal e sua possível ativação por ET-1"*, registrado com o número **213/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro,** envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de janeiro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 160 camundongos C57Bl/6 machos pesando 25g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; e 160 camundongos transgênicos machos (linhagens Nalp-3 KO e Caspase-1 KO) pesando 25g, oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 30/01/2017 a 15/02/2019.

We certify that the Protocol ***nº 213/2016,*** entitled ***"Role of NLRP3 on erectile dysfunction in DOCA/salt hypertensive model and its possible activation by ET-1"***, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *01/30/2017*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 160 male C57Bl/6 mice weighing 25g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; and 160 male transgenic mice (strains Nalp-3 KO and Caspase-1 KO) weighing 25g, from the Special Mice Breeding Center of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 02/15/2019.

Ribeirão Preto, 30 de janeiro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
(16)3315-3301

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS
natureresearch

Corrected: Author Correction

OPEN

The inflammasome NLRP3 plays a dual role on mouse corpora cavernosa relaxation

Rafael S. Fais[1], Fernanda L. Rodrigues[2], Camila A. Pereira[1], Allan C. Mendes[1], Fabíola Mestriner[1], Rita C. Tostes[1] & Fernando S. Carneiro[1*]

NLRP3 plays a role in vascular diseases. Corpora cavernosa (CC) is an extension of the vasculature. We hypothesize that NLRP3 plays a deleterious role in CC relaxation. Male C57BL/6 (WT) and NLRP3 deficient (NLRP3$^{-/-}$) mice were used. Intracavernosal pressure (ICP/MAP) measurement was performed. Functional responses were obtained from CC strips of WT and NLRP3$^{-/-}$ mice before and after MCC950 (NLRP3 inhibitor) or LPS + ATP (NLRP3 stimulation). NLRP3, caspase-1, IL-1β, eNOS, nNOS, guanylyl cyclase-β1 (GCβ1) and PKG1 protein expressions were determined. ICP/MAP and sodium nitroprusside (SNP)-induced relaxation in CC were decreased in NLRP3$^{-/-}$ mice. Caspase-1, IL-1β and eNOS activity were increased, but PKG1 was reduced in CC of NLRP3$^{-/-}$. MCC950 decreased non-adrenergic non-cholinergic (NANC), acetylcholine (ACh), and SNP-induced relaxation in WT mice. MCC950 did not alter NLRP3, caspase-1 and IL-1β, but reduced GCβ1 expression. Although LPS + ATP decreased ACh- and SNP-, it increased NANC-induced relaxation in CC from WT, but not from NLRP3$^{-/-}$ mice. LPS + ATP increased NLRP3, caspase-1 and interleukin-1β (IL-1β). Conversely, it reduced eNOS activity and GCβ1 expression. NLRP3 plays a dual role in CC relaxation, with its inhibition leading to impairment of nitric oxide-mediated relaxation, while its activation by LPS + ATP causes decreased CC sensitivity to NO and endothelium-dependent relaxation.

The corpora cavernosa (CC) are the primary structure responsible for penile erection. These structures depend on the abundant blood supply to carry out their function[1–4]. The CC tonus is modulated by the activity of the sympathetic (SNS) and parasympathetic (PNS) autonomic nervous system[4–7]. The SNS is responsible for the maintenance of the flaccid state of the penis through the release of noradrenaline (NA), which leads to the activation of calcium-dependent and -independent signaling pathways that promote CC smooth muscle contraction. On the other hand, the PNS induces CC relaxation, by nitric oxide (NO) release, directly from nitrergic nerve-endings containing neuronal NO synthase (nNOS) or the activation of the endothelial NO synthase (eNOS) isoform by acetylcholine from cholinergic nerve-endings.

The erectile function is closely linked with vascular function, mainly due to the similarity of the structures that form the cavernosal spaces and the arterioles[4–7].

Several studies suggest that the immune system play a role in CC tone modulation through the release and activation of inflammatory mediators[8–10]. Toll-like receptors (TLR) overactivation impairs the reactivity of CC mainly by the release of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-1β[11,12]. These mediators stimulate CC contractile responses, through increased RhoA/Rho Kinase activity[11], and reduction of NO bioavailability, which decreases the relaxation of CC[12]. Elevated levels of these cytokines may also lead to CC structural changes in chronic conditions[13–19].

IL-1β is the product of inflammasome activation[20,21]. The inflammasome is a multiprotein complex of the innate immune system, and the nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich repeat containing pyrin 3 (NLRP3) is the most studied receptor of this complex. NLRP3 depends on two signals for its activation. First, nuclear factor kappa B (NF-κB) activation, mainly via TLR4, releases inactive forms of cytokines as well as components of the inflammasome complex[22]. The second signal occurs through a membrane perturbation, such as pore-forming proteins in the membrane, ATP-P2X channels overactivation, increased reactive oxygen species (ROS) generation, phagolysosomal or mitochondrial destabilization[23]. The second signal leads to NLRP3

[1]Departments of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. [2]Departments of Physiology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. *email: fsilvac@usp.br

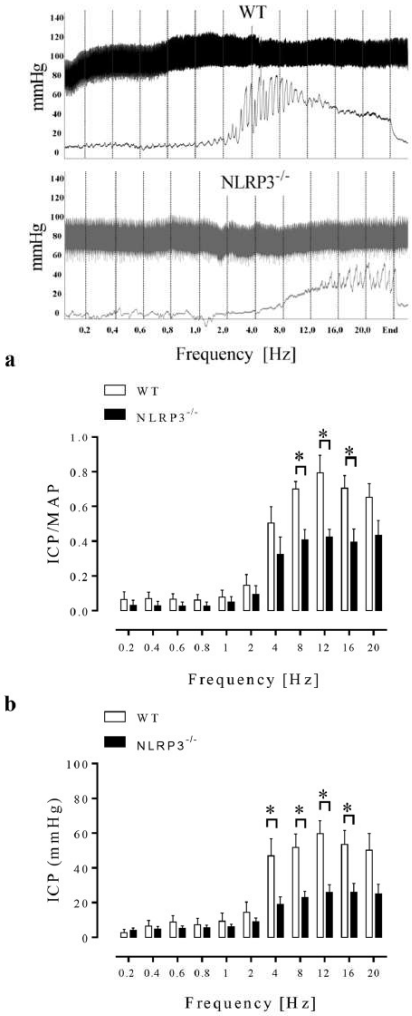


Figure 1. Effect of NLRP3 deletion in the ICP/MAP ratio (**a**) and raw ICP data (**b**). Graph depicts the ICP/MAP ratio and raw ICP response to cavernosal nerve stimulation assessed over a range of frequencies (0.2–20 Hz). Data represent the mean ± SEM values of the groups (graph in the left). Representative tracings showing changes in intracavernosal pressure (bottom traces) and blood pressure (top traces) in response to electrical stimulation of the cavernosal nerve stimulation (right of the figure). *$p < 0.05$ compared to WT group. n = 5–6. The comparison of each frequency value for the ICP/MAP ratio and raw ICP of WT (white bars) and NLRP3$^{-/-}$ (black bars) was performed by Student's t-test. ICP = intracavernosal pressure; MAP = mean arterial pressure.

oligomerization and assembly of the inflammasome complex, which promotes caspase-1 auto-cleavage and subsequent processing and release of the active forms of IL-1β and IL-18[22–26]. The components of the inflammasome are closely linked with the onset of vascular dysfunction, leading to functional and/or structural damage[27–31]. Based on these data, we hypothesized that NLRP3 plays a detrimental role in the modulation of the CC relaxation, which may predispose to erectile dysfunction (ED) development.

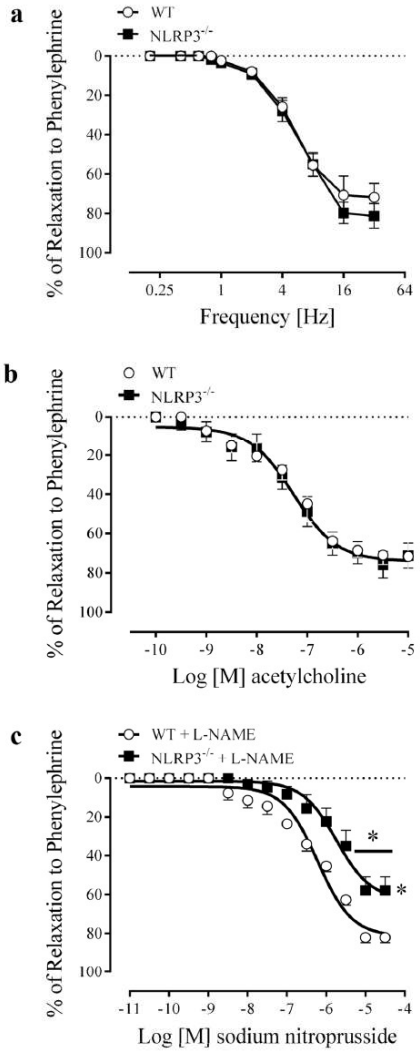


Figure 2. Frequency-response curves for NANC-induced relaxation (**a**), concentration-effect curves to acetylcholine (100 pM–10 μM) (**b**) and sodium nitroprusside (10 pM–30 μM) (**c**) in CC strips of WT (white spheres) and NLRP3$^{-/-}$ (black squares) mice. Data represent the mean ± SEM values of the groups. *$p < 0.05$ compared to WT group. n = 4–6. The comparison of each frequency value for NANC-induced relaxation, pEC_{50} and Emax parameters was performed by Student's t-test.

Materials and Methods

Animals. Male C57BL/6 (WT) and NLRP3$^{-/-}$ mice were housed in a room with controlled temperature (20 to 22 °C) and on light/dark cycles of 12 hours with free access to standard chow and filtered water. Mice were used at 10 to 12 weeks of age (25 g). All experimental animal protocols followed the regulations of the National Council on Animal Experimental Control (CONCEA, Brazil) and were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA n° 005/2015-1) at Ribeirao Preto Medical School.

Drugs and solutions. Physiological Krebs Henseleit buffer of the following composition was used: NaCl 130 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.18 mM, $MgSO_4.7H_2O$ 1.17 mM, $NaHCO_3$ 14.9 mM, EDTA 0.026 mM,

Drug	WT vehicle	WT MCC950		
Pharmacological inhibition of NLRP3 with MCC950				
ACh				
pEC_{50}	6.90 ± 0.09	6.32 ± 0.09*		
Emax	80.50 ± 8.91	53.93 ± 3.87*		
SNP				
pEC_{50}	7.25 ± 0.06	6.67 ± 0.08*		
Emax	100 ± 3.40	100 ± 6.18		
Concentration-effect curves in CC from NLRP3$^{-/-}$ mice				
Drug	**WT**	**NLRP3$^{-/-}$**		
ACh				
pEC_{50}	7.27 ± 0.10	7.26 ± 0.11		
Emax	71.61 ± 7.84	75.86 ± 6.84		
SNP				
pEC_{50}	6.22 ± 0.06	5.73 ± 0.10*		
Emax	80.02 ± 2.45	63.11 ± 5.23*		
Activation of NLRP3 with LPS + ATP				
Drug	**WT vehicle**	**WT LPS + ATP**	**NLRP3$^{-/-}$ vehicle**	**NLRP3$^{-/-}$ LPS + ATP**
ACh				
pEC_{50}	6.74 ± 0.07	6.90 ± 0.09	6.88 ± 0.06	6.90 ± 0.12
Emax	79.28 ± 5.21	54.60 ± 5.69*	68.29 ± 2.10	61.41 ± 10.66
SNP				
pEC_{50}	7.29 ± 0.14	6.61 ± 0.06*	7.04 ± 0.09	6.68 ± 0.10
Emax	100 ± 4.80	100 ± 2.64	100 ± 3.25	100 ± 3.99

Table 1. Values of Emax (%) and pEC_{50} for the concentration-effect curves to ACh and SNP in CC from WT and NLRP3$^{-/-}$ mice under conditions of stimulation (LPS + ATP) or inhibition (MCC950) of the NLRP3 inflammasome. Values are mean ± SEM (n = 4 to 6 in each group). *$p < 0.05$ WT vehicle vs WT MCC950, WT vs NLRP3$^{-/-}$ or WT vehicle vs WT LPS + ATP. The comparison of pEC_{50} and Emax parameters was performed by Student's t-test.

$CaCl_2.2H_2O$ 1.6 mM and D-glicose 5.55 mM. The incubations were performed with MCC950 (1 μM[32] Cayman Chemical 17510; diluted in 5% DMSO and 95% deionized water), lipopolysaccharide (LPS) (1 μg/mL; diluted in deionized water), adenosine 5-triphosphate (ATP) [(2 mM, Sigma-Aldrich A6144; diluted in deionized water).

To evaluate the relaxation, the following drugs were used: acetylcholine (ACh) (100 pM–10 μM; diluted in deionized H_2O), sodium nitroprusside (SNP) (10 pM–30 μM; NO donor), phenylephrine (10 μM), guanethidine (30 μM), atropine (1 μM) and L-NAME (100 mM) purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Stock solutions were prepared in deionized water and stored in aliquots at −20 °C; dilutions were made up immediately before use.

Cavernosal tissue reactivity. Cavernosal strips were isolated and mounted in 5 mL-myograph chambers (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) containing Krebs Henseleit buffer continuously bubbled with a mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 and maintained at 37 °C. The tissues were stretched to a resting force of 2.5 mN and allowed to equilibrate for 60 min Changes in isometric force were recorded using a PowerLab/8SP data acquisition system (Chart software, version 5.2; ADInstruments, Colorado Springs, CO). A solution containing high concentration of potassium chloride (KCl, 120 mM) was added to the organ baths at the end of the equilibration period to verify the contractile ability of the preparations. The CC strips were divided into three groups: group 1 – WT and NLRP3$^{-/-}$ CC strips; group 2 – WT CC strips incubated with NLRP3 MCC950 or vehicle for 2 hours; group 3 – WT and NLRP3$^{-/-}$ CC strips incubated with vehicle or LPS for 4 hours followed by stimulation with ATP for 10 minutes (LPS + ATP).

Relaxation responses were evaluated by cumulative concentration-response curves for ACh and SNP in CC strips contracted with phenylephrine. All SNP concentration-response curves were performed after incubation with L-NAME (100 μM; diluted in deionized H_2O) to prevent interference of basal NO production. Electrical field stimulation (EFS) (20 V, 0.2 to 32 Hz) was performed to determine non-adrenergic non-cholinergic (NANC)-mediated relaxations. Briefly, it was performed an incubation (30 minutes) with guanethidine (30 μM) and atropine (1 μM); the strips were then contracted with phenylephrine (10 μM). After reaching a plateau, the EFS was performed to observe the relaxation. Each stimulation lasted 10 s, and an interval between stimuli was allowed until full recovery of the resting tension.

Western blot assay. The CC were isolated, cleaned from surrounding fat tissue, snap frozen in liquid nitrogen and homogenized in a lysis buffer [50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 1 mM EDTA, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml pepstatin, 1 μg/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), and 1 mM sodium fluoride][33]. Protein concentration was determined by the Bradford assay. Spectra multicolor broad range protein ladder (10 to 260 KDa) was used as a protein standard. Aliquots

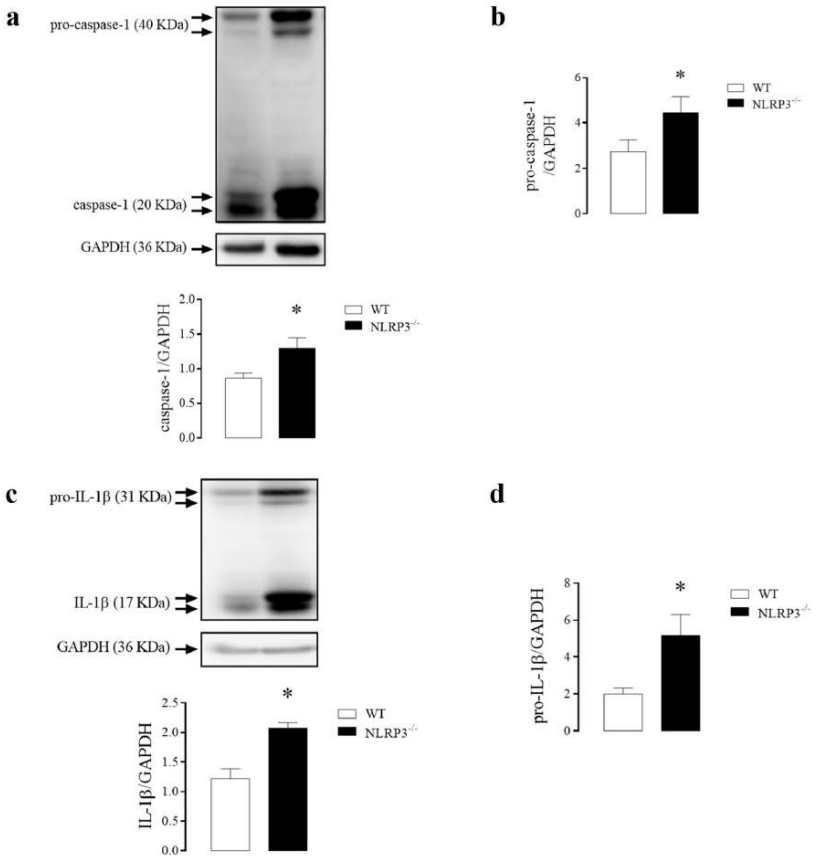


Figure 3. Densitometric analysis of caspase-1 (**a**), pro-caspase-1 (**b**), IL-1β (**c**) and pro-IL-1β (**d**) in CC strips of WT (white bar) and NLRP3$^{-/-}$ (black bar) mice. The expression of GAPDH was determined and used as the internal control. The bars represent the mean ± SEM values of protein expression. *$p < 0.05$ compared to WT group. n = 6–8. The comparison of protein expression was performed by Student's t-test.

with 30 µg of proteins were prepared and separated by electrophoresis at 100 V for 2 hours at 4 °C in 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred for 1 hour to a nitrocellulose membrane at 100 V at 4 °C. Gels were stained with Coomassie blue and membranes with Ponceau red 2% to demonstrate the transference efficiency. Nonspecific binding sites of the membrane to the primary antibodies were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) solution for 1 hour at room temperature. The primary antibodies described below were incubated for 12 hours at 4 °C, and the secondary antibodies were incubated for 1 hour at room temperature. Protein bands visualization were obtained by chemiluminescence after ECL reaction (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) and image capture performed on ImageQuant 350 gel imager (GE Healthcare, Piscata Way, NJ, USA). The densitometric quantification was performed by ImageJ® software. Membranes were stripped with restore western blot stripping buffer (Thermo) for 45 minutes at 37 °C. The following antibodies were used in the study: NLRP3 (MAB7578, diluted 1:500, R&D), caspase-1 (IMG-5028, diluted 1:500, Imgenex), IL-1β [(H-153)-SC-7884, diluted 1:500, Santa Cruz Biotechnology], phospho-eNOS [(ser1177)-9571S, diluted 1:500, Cell Signal], eNOS (9572 S, diluted 1:500, Cell Signaling), nNOS (4234 S, diluted 1:1.000, Cell Signaling), PKG1 (3248 S, diluted 1:500, Cell Signaling), guanylyl cyclase α (GCα) (AB50358, diluted 1:1.000, Abcam), guanylyl cyclase β (GCβ) (SAB4501344, diluted 1:1.000, Sigma-Aldrich). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (G9545, diluted 1:5.000, Sigma-Aldrich) expression was used as endogenous control for normalization of all proteins. Membranes were then incubated with the following secondary antibodies: goat anti-mouse IgG H&L (AB6789, diluted 1:10.000, Abcam), goat anti-rabbit IgG H&L (AB6721, diluted 1:10.000, Abcam), rabbit anti-rat IgG (AB6703, diluted 1:3.000, Abcam).

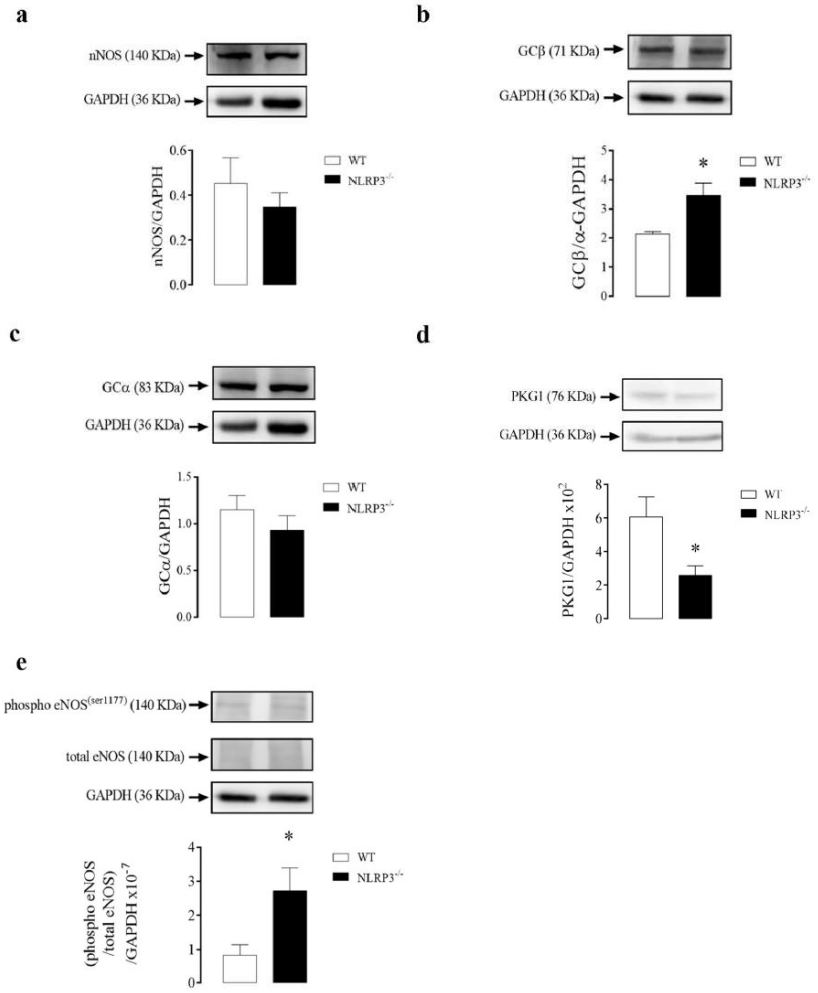


Figure 4. Densitometric analysis of nNOS (**a**), GCβ (**b**), GCα (**c**), PKG1 (**d**) and eNOS phosphorylation (**e**) expressions in CC strips of WT (white bars) and NLRP3$^{-/-}$ (black bars) mice. The expression of GAPDH was determined and used as the internal control. Data represent the mean ± SEM values of protein expression. *$p < 0.05$ compared to WT group. n = 4–6. The comparison of protein expression was performed by Student's t-test.

***In vivo* measurements of intracavernosal pressure and mean arterial pressure.** The animals were anesthetized with 2% isoflurane in 100% oxygen (2 L/min). Then, the left carotid artery and right CC of each mouse were cannulated for continuous monitoring of mean arterial pressure (MAP) and intracavernous pressure (ICP), respectively. Finally, the cavernosal nerve (CNV) was stimulated electrically with silver electrodes at different frequencies (5 V, 1 ms pulses, and frequencies between 0.2 and 20 Hz) to induce changes in ICP. During the stimulation these animals were maintained anesthetized with isoflurane 1% in 100% oxygen (2 L/min).

Statistical analysis. The results were analyzed by the Student's t-test. Values of p less than 0.05 were considered statistically significant. The contractile responses were represented as the force developed from the baseline tonus in millinewtons (mN) normalized by the dry weight (g) of individual CC strips in a given number (n) of experiments. On the other hand, relaxation responses were expressed as the percentage change from pre-contraction induced by phenylephrine. Concentration-effect curves were submitted to non-linear regression analysis using the GraphPad

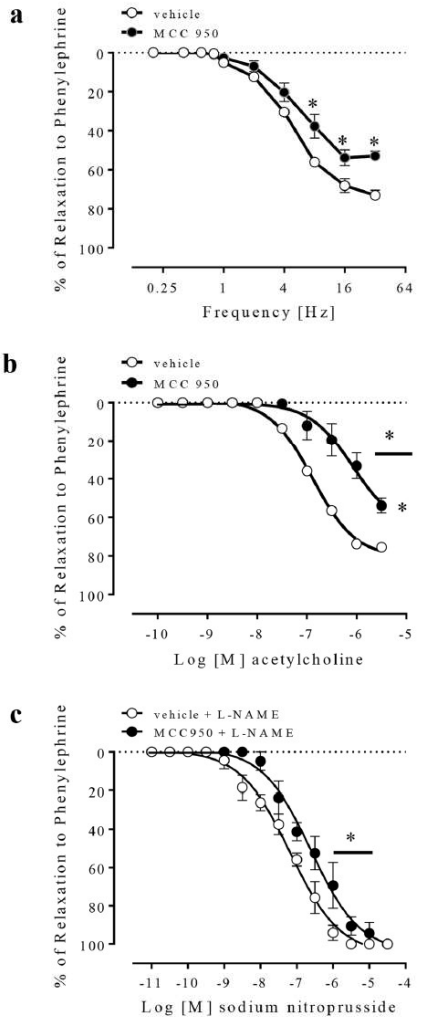


Figure 5. Frequency-response curves for NANC-induced relaxation (**a**), concentration-effect curves to acetylcholine (100 pM–3 μM) (**b**) and sodium nitroprusside (10 pM–30 μM) (**c**), in vehicle- (white spheres) or MCC950-treated (1 μM, black spheres) CC strips from WT mice. Data represent the mean ± SEM values of the groups. *$p < 0.05$ compared to vehicle group. n = 5–6. The comparison of each frequency value for NANC-induced relaxation, pEC_{50} and Emax parameters was performed by Student's t-test.

Prism program (GraphPad Prism 6.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Agonist potency and maximal response were expressed as pEC_{50} (negative logarithm of molar concentration producing 50% of the maximal response) and E_{max} (maximal effect produced by the agonist), respectively. Statistical analysis of the E_{max} and pEC_{50} values was performed using nonlinear regression followed by Student's t-test.

Results

Effect of NLRP3 deletion on the erectile function of mice. The first set of experiments shows that *in vivo* measurement of ICP demonstrated that electrical stimulation of the cavernosal nerve induced frequency-dependent ICP changes in $NLRP3^{-/-}$ and WT mice. The ICP/MAP ratio at 8, 12 and 16 Hz was decreased in $NLRP3^{-/-}$ mice (Fig. 1a). In addition, the ICP alone at 4, 8, 12 and 16 Hz was decreased in $NLRP3^{-/-}$ mice (Fig. 1b). These data suggest that $NLRP3^{-/-}$ mice display decreased erectile function.

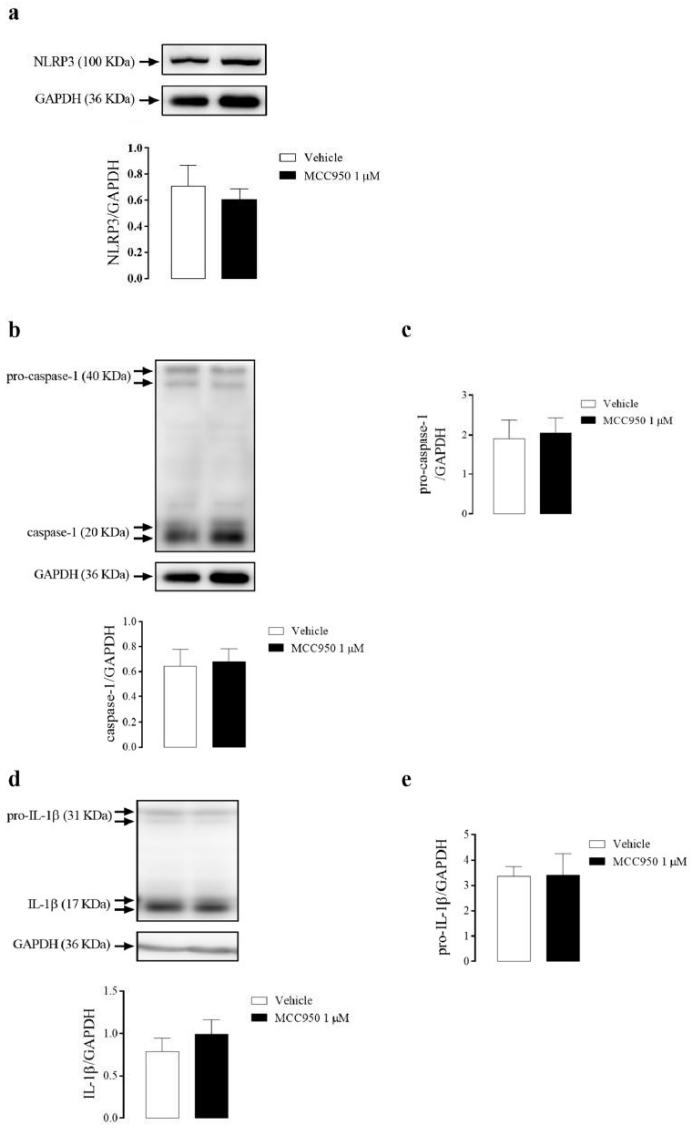


Figure 6. Densitometric analysis of NLRP3 (**a**), caspase-1 (**b**), pro-caspase-1 (**c**), IL-1β (**d**) and pro-IL-1β (**e**) expression in CC strips of WT mice incubated with MCC950 (1 μM, black bars) or vehicle (white bars). The expression of GAPDH was determined and used as the internal control. The bars represent the mean ± SEM values of protein expression. n = 5–6. The comparison of protein expression was performed by Student's t-test.

NLRP3 downstream signaling pathway and CC reactivity in NLRP3 knockout mice. No differences in NANC- or ACh-induced relaxation (Fig. 2a,b) were observed between CC strips of WT and NLRP3$^{-/-}$ mice. However, SNP-mediated relaxation was decreased in CC strips of NLRP3$^{-/-}$ mice compared to WT (Fig. 2c). The values of pEC_{50} and Emax for the relaxation induced by ACh and SNP are described in Table 1.

The CC of NLRP3$^{-/-}$ mice displayed increased expression of caspase-1 (Fig. 3a), pro-caspase-1 (Fig. 3b), IL-1β (Fig. 3c) and pro-IL-1β (Fig. 3d) when compared to WT mice.

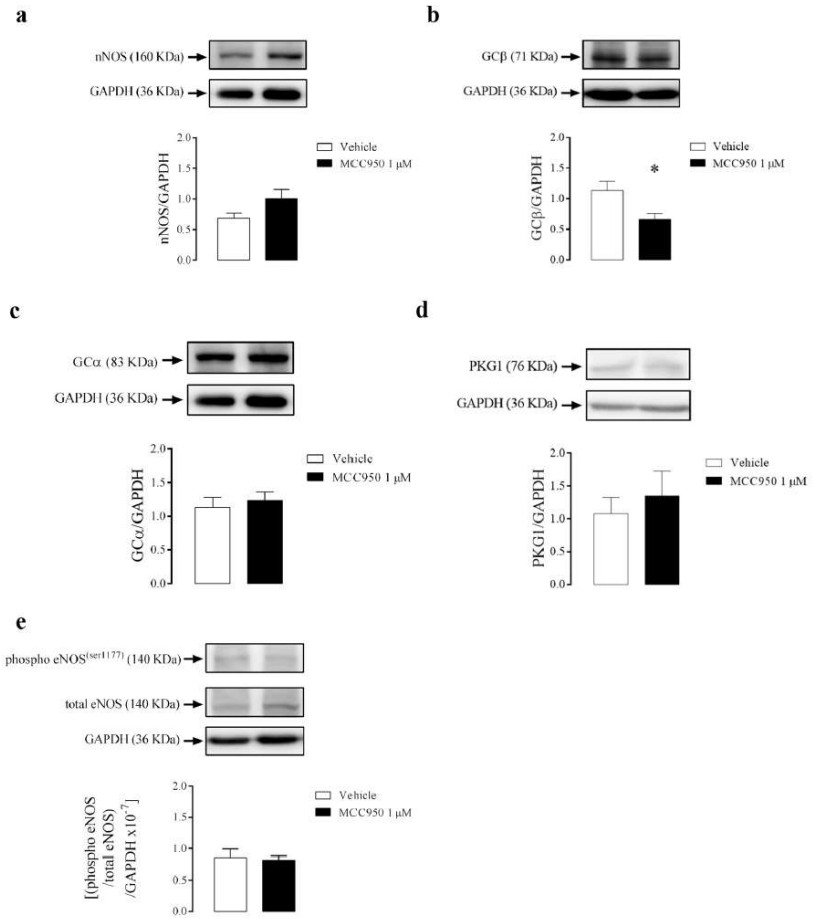


Figure 7. Densitometric analysis of nNOS (**a**), GCβ (**b**), GCα (**c**), PKG1 (**d**) and eNOS phosphorylation (**e**) expressions in CC strips of WT mice incubated with MCC950 (1 μM, black bars) or vehicle (white bars). The expression of GAPDH was determined and used as the internal control. Data represent the mean ± SEM values of protein expression. *$p < 0.05$ compared to vehicle group. n = 5–6. The comparison of protein expression was performed by Student's t-test.

Effect of NLRP3 deletion on the signaling pathways of CC relaxation. There were no changes in nNOS (Fig. 4a) protein expression in CC of NLRP3$^{-/-}$ mice. On the other hand, GCβ expression (Fig. 4b), but not GCα (Fig. 4c) was increased in CC of NLRP3$^{-/-}$ mice when compared to control animals. Also, CC strips of NLRP3$^{-/-}$ mice showed decreased expression of PKG1 (Fig. 4d) and increased eNOS phosphorylation (Fig. 4e).

Effect of NLRP3 pharmacological inhibition on CC reactivity. NANC-induced relaxation was decreased in CC strips in the presence of a NLRP3 inhibitor (Fig. 5a). Similarly, endothelium-dependent relaxation to ACh (Fig. 5b) and endothelium-independent relaxation to SNP (Fig. 5c) were decreased in CC strips treated with MCC950. The values of pEC_{50} and Emax for the relaxation induced by ACh and SNP are described in Table 1.

Inhibition of NLRP3 with MCC950 did not alter the expression of NLRP3 (Fig. 6a), caspase-1 (Fig. 6b), pro-caspase-1 (Fig. 6c), IL-1β (Fig. 6d), or pro-IL-1β (Fig. 6e) in the CC of WT mice.

Effect of NLRP3 pharmacological inhibition on the signaling pathways of CC relaxation. There was no change in the protein expression levels of nNOS (Fig. 7a) and reduction of GCβ (Fig. 7b) in CC strips from

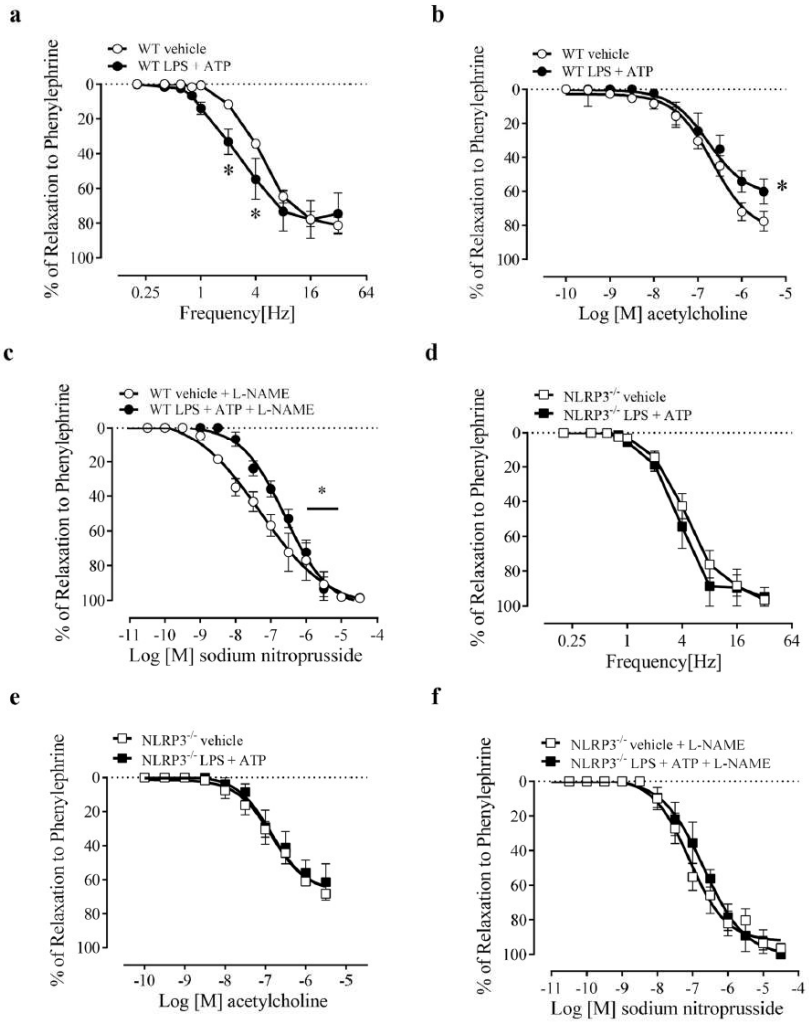


Figure 8. Frequency-response curves for NANC-induced relaxation (**a**,**d**), concentration-effect curves to acetylcholine (100 pM–3 μM) (**b**,**e**) and sodium nitroprusside (10 pM–30 μM) (**c**,**f**) in mice CC strips of WT vehicle (white spheres), WT incubated with LPS + ATP (1 μg/mL + 2 mM) (black spheres), NLRP3$^{-/-}$ vehicle (black square) and NLRP3$^{-/-}$ incubated with LPS + ATP (1 μg/mL + 2 mM) (white square). Data represent the mean ± SEM values of the groups. *$p < 0.05$ compared to WT LPS + ATP group. n = 5–6. The comparison of each frequency values for NANC-induced relaxation, pEC_{50} and Emax parameters was performed by Student's t-test.

WT mice after incubation with MCC950. Nevertheless, MCC950 incubation did not alter the expression of GCα (Fig. 7c), PKG1 (Fig. 7d) and eNOS phosphorylation (Fig. 7e) in CC strips from WT mice.

Effect of NLRP3 activation on CC reactivity. The activation of NLRP3, with LPS + ATP incubation, increased NANC- potency (Fig. 8a), reduced the ACh- maximal response (Fig. 8b) and SNP-mediated relaxation potency (Fig. 8c) in CC of WT mice. However, these functional changes were prevented in CC from NLRP3$^{-/-}$ mice (Fig. 8d–f). The values of pEC_{50} and Emax induced by ACh and SNP are described in Table 1.

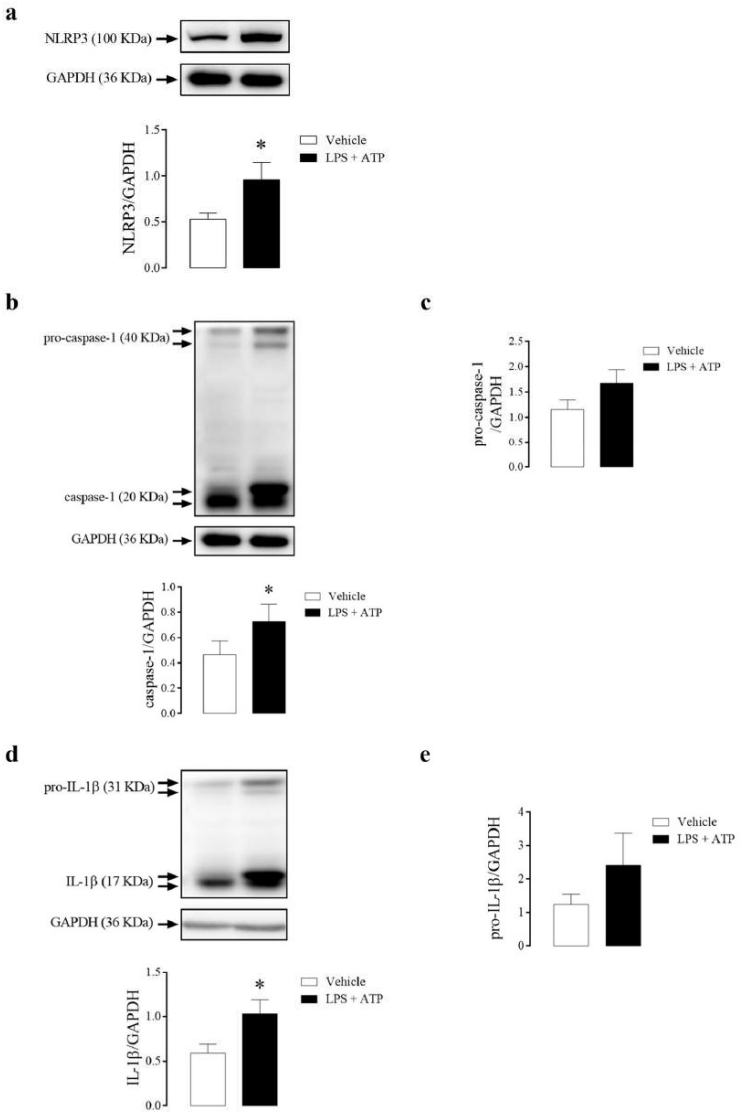


Figure 9. Densitometric analysis of NLRP3 (**a**), caspase-1 (**b**), pro-caspase-1 (**c**), IL-1β (**d**) and pro-IL-1β (**e**) expression in CC strips of WT mice incubated with LPS + ATP (1 μg/mL + 2 mM, black bars) or vehicle (white bars). The expression of GAPDH was determined and used as the internal control. The bars represent the mean ± SEM values of protein expression. *$p < 0.05$ compared to respective control group. n = 5–6. The comparison of protein expression was performed by Student's t-test.

The stimulation of mice CC with LPS followed by ATP increased NLRP3 protein expression (Fig. 9a), caspase-1 (Fig. 9b), but not pro-caspase-1 (Fig. 9c) expression, and also increased IL-1β (Fig. 9d) and a tendency to increase pro-IL-1β (Fig. 9e) expression.

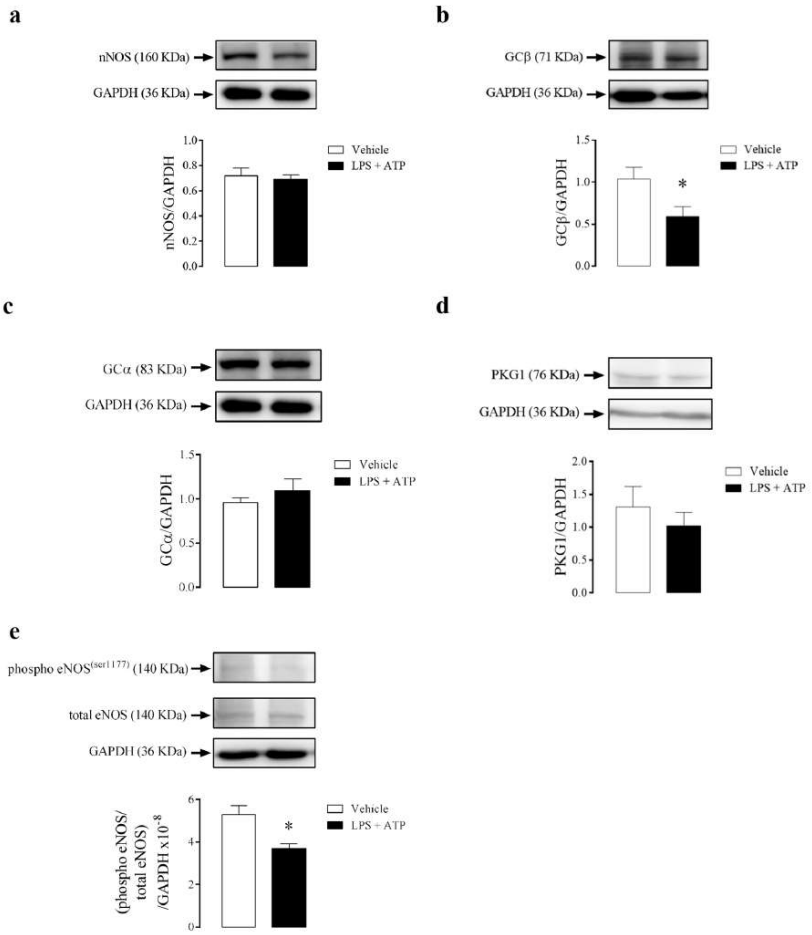


Figure 10. Densitometric analysis of nNOS (**a**), GCβ (**b**), GCα (**c**), PKG1 (**d**) and eNOS phosphorylation (**e**) in CC strips of WT mice incubated with LPS + ATP (1 μg/mL + 2 mM, black bars) or vehicle (white bars). The expression of GAPDH was determined and used as the internal control. Data represent the mean ± SEM values of protein expression. *$p < 0.05$ compared to vehicle group. n = 5–6. The comparison of protein expression was performed by Student's t-test.

Effect of NLRP3 activation on the signaling pathways of CC relaxation. Activation of NLRP3, by LPS + ATP, did not change nNOS (Fig. 10a) expression. Nevertheless, it reduced GCβ (Fig. 10b) without changes in the GCα (Fig. 10c) and PKG1 (Fig. 10d) protein expression when compared to control animals. Also, the CC strips of WT mice showed and decreased phosphorylation of eNOS (Fig. 10e).

Supplemental data. All the Western blotting full representative membranes and the GAPDH statistics are present in the supplemental data (Figs s1–s9).

Discussion

The results of the present study indicate that NLRP3 has a dual role in mice CC relaxation, with its inhibition leading to impairment of NO-mediated relaxation, while its overactivation causes a decreased cavernosal smooth muscle sensitivity to NO and endothelium-dependent relaxation. NLRP3, an essential member of the innate immune system, overactivation or inhibition impairs, respectively, the nitric oxide- and endothelium-mediated CC relaxation. Indeed, NLRP3 plays a crucial role in the cardiovascular system, since vascular cells can detect and respond to

damage-associated molecular patterns (DAMPs) or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) via TLRs and NLRs. Therefore, it promotes the release of cytokines, chemokines and dilating hormones[31,34,35], which facilitates the transfer and migration of leukocytes to the lesion site[36–38]. Erectile dysfunction (ED) and cardiovascular diseases share the same risk factors[39]. As an example, the sustained presence of low-grade inflammatory mediators in patients with ED and coronary artery diseases is well documented[40]. Nevertheless, it was still unknown whether the machinery that produces inflammatory mediators contributes to modulate the tonus of CC.

Clinical and experimental evidence show that increased activity of the innate immune system is implicated in the pathogenesis of ED[11,41], atherosclerosis[42], acute coronary syndrome[43], and cerebrovascular accidents[44]. The exact mechanism by which the innate immune system acts in the genesis of ED or cardiovascular diseases has not yet been fully elucidated. Perhaps the contribution of the immune system to cardiovascular diseases and ED development is the exacerbation of the inflammatory process, which may contribute to the generation of vascular and CC lesions[10,45]. Further support to this idea is the fact that the increased levels of proinflammatory cytokines are closely linked to the genesis of ED[11].

Considering the facts mentioned above, the present manuscript determined whether NLRP3, a protein involved in IL-1β and IL-18 maturation, contributes to CC relaxation modulation. Initially, it was demonstrated that NLRP3 is not only expressed and displayed in a constitutive manner, but it can also be activated in CC of mice. These findings are determined by the following facts: (1) there are active caspase-1 and IL-1β in mice CC at basal conditions; and (2) LPS + ATP stimulus is able to increased NLRP3 expression, caspase-1 and IL-1β release in CC, which is similar to NLRP3 activation in cells of the immune system[46,47]. The basal activity of NLRP3 in CC suggests that it may modulate CC function at physiological levels. Also, its activation may contribute to functional changes at pathophysiological states. Since NLRP3 is expressed and active in CC, we decided to dig deeper in our research on the effect of NLRP3 inhibition in CC.

The CC from NLRP3$^{-/-}$ mice showed higher expression of caspase-1, pro-caspase-1, pro-IL-1β, and IL-1β. This effect may occur due to overactivation of other NLR or TLR evoked by the absence of NLRP3 in CC. The inflammasome is a dynamic multiprotein complex, whereas different components of the inflammasome family could be recruited to form the same platform in bone marrow macrophages infected with Salmonella[48] or in glomerular infections[49]. Indeed, it has been demonstrated that the activation of inflammasome can occur through dual activation of the NLRP3 and NLR family of caspase recruitment domain-(CARD)-containing protein 4 (NLRC4) platforms. Therefore, it is possible that NLRP3 absence may lead to the NLRC4 increase[48]. The increased cytokine expression in CC from NLRP3$^{-/-}$ mice was associated with an impairment of the erectile function and sodium nitroprusside-induced relaxation in CC. Taken together, these results suggest that compensatory changes induced by the NLRP3 deletion in CC may account for the differences observed in functional responses between NLRP3 pharmacological inhibition and NLRP3$^{-/-}$ mice.

Our next step was to investigate whether the pharmacological inhibition would cause the same effects observed after its genetic inhibition upon the cavernosal functional responses. The small molecule MCC950 is a potent and selective inhibitor of NLRP3. Coll and co-workers[32] demonstrated that MCC950, at nanomolar concentrations, inhibits NLRP3, but not other inflammasomes, such as AIM2, NLRC4, and NLRP1. Furthermore, MCC950 reduced IL-1β production *in vivo* and rescued the neonatal lethality in a mouse model of the cryopyrin-associated periodic syndrome, and it was effective in *ex vivo* samples from individuals with Muckle-Wells syndrome[32]. Both syndromes are characterized by four different missense mutations in the exon 3 of the NLRP3 gene, which cause gain-of-function and defines NLRP3 as a critical component of the inflammatory process[50].

Following the previous idea, in this study, the pharmacological inhibition of NLRP3 did not change basal caspase-1 activation and IL-1β release. This result could indicate that NLRP3 is not the sole responsible for the maintenance of the basal levels of caspase-1 and IL-1β. Also, it suggests that another member of the inflammasome family may partially assume NLRP3 function after its inhibition. NLRP3 activation is mainly driven by oxidative stress[51] and cytokines release[52]. Also, its activation is closely linked to vascular function impairment[53] and to the generation and/or worsening of cardiovascular[54] and metabolic[55] diseases, such as arterial hypertension[56,57], atherosclerosis[58], diabetes[59], and obesity[60,61]. These effects occur because increased IL-1β or IL-18 cytokines promote endothelial dysfunction[62,63] and vascular smooth muscle proliferation[64,65]. In contrast, the present study demonstrated that NLRP3 inhibition impaired the endothelium-dependent and endothelium-independent relaxation.

The canonical activation of NLRP3 uses the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), an adaptor protein, to activate caspase-1 and, subsequently, the release of IL-1β and IL-18[66]. On the other hand, the non-canonical activation of NLRP3 is mediated by caspase-11, which triggers caspase-1-independent macrophage death and caspase-1-dependent IL-1β and IL-18 production in response to inflammasome activators. Caspase-11 is expressed not only in cells of the immune system but also in the epithelium[67–69]. The present study indicates that NLRP3 may modulate the cavernosal smooth muscle relaxation, at least partially, independent of its canonical and noncanonical role, since MCC950 did not inhibit caspase-1 and IL-1β production at basal conditions.

The NO is synthesized by the constitutive forms of NOS: the nNOS and eNOS. These enzymes are coupled to Ca^{2+} and calmodulin and are involved in the relaxation of CC. NO-induced soluble guanylyl cyclase (GC) stimulation is essential in the erectile process, and it has been reviewed in detail[70,71]. GC catalyzes the conversion of guanosine triphosphate (GTP) into cyclic guanosine monophosphate (cGMP). cGMP activates the PKG1, promotes depletion of cytosolic calcium (Ca^{2+}), and this leads to CC smooth muscle relaxation[6,72,73]. NO may be also produced by the inducible NOS (iNOS) isoform, which is expressed in inflammatory condition such as endotoxemia induced by LPS treatment[74].

Surprisingly NLRP3$^{-/-}$ mice displayed increased eNOS phosphorylation and GCβ protein expression in CC. Conversely, the pharmacological inhibition of NLRP3 with MCC950 impaired CC relaxation. In conjunction, there was a reduction in GCβ subunit expression, which may account for cavernosal decreased relaxation.

NO/cGMP pathway has an anti-inflammatory effect by reducing the expression of intracellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) induced by TNF-α in rat aorta[75] or in carrageenan model of hypernociception[76]. Also, NO inhibits the NLRP3 inflammasome activation in macrophages, which may involve S-nitrosylation of NLRP3 and caspase-1[77]. Therefore, it is tempting to speculate that the increased eNOS phosphorylation and GCβ may occur to counteract the increased expression of IL-1β in the CC of NLRP3$^{-/-}$ mice. On the other hand, the PKG1 expression is reduced in the CC of NLRP3$^{-/-}$ mice, and this could indicate that NLRP3 modulates the NO-dependent relaxation in CC.

Experiments were also performed to determine whether the NLRP3 activation would promote opposite effects from those after NLRP3 genetic deletion or its pharmacological inhibition. Indeed, CC stimulation with LPS + ATP (NLRP3 activation) decreased ACh-(endothelium-dependent) and SNP-(endothelium-independent)-induced relaxation. High cytokine levels lead to increased ROS generation and impair the NO/cGMP pathway[62,78]. Based on these results we speculate that increased caspase-1 and IL-1β may lead to endothelial and smooth muscle dysfunction, which then underlie cavernosal reactivity dysfunction. Further support to this idea is the fact that CC from NLRP3$^{-/-}$ mice, which exhibited increased caspase-1 and IL-1β, also displayed reduced relaxation to a NO donor. However, it is noteworthy that the NLRP3 activation was performed with ATP (as a second signal to activate NLRP3) and mice CC not only express purinergic receptors but also respond to their activation. ATP decreases phenylephrine-induced contraction in preparations of CC from rabbits[79,80] and acts as a potent relaxant agent in CC from humans[81]. Also, the sequential hydrolysis of ATP may result in adenosine formation, which directly relaxes mice CC[82,83]. Therefore, ATP and other metabolic breakdown products may account for some of the effects observed in the present study. The development of pharmacological tools (agonists) more specific to activate NLRP3 in CC will enable to rule out this possibility. On the other hand, LPS + ATP increased the relaxation response to EFS. The relaxation produced by EFS is mainly dependent on nNOS activity. Previous studies have shown inconsistent results on nNOS expression after LPS stimulation. As an example, the expression of nNOS increased in rat oligodendrocytes[84] and paraventricular nucleus[85], and vena cava[86] of pigs. Nevertheless, nNOS expression decreased in rat cardiac myocytes after LPS[87] incubation. In the present study, LPS + ATP stimulation did not change nNOS expression in mice CC, suggesting that nNOS is not involved in the increased functional response to EFS-induced relaxation. Therefore, additional studies are required to investigate the mechanisms responsible for increased CC relaxation evoked by EFS after LPS + ATP stimuli.

NLRP3 activation reduced the activity of eNOS and expression of GCβ in CC. Indeed, increased activity of NLRP3 impairs the endothelial function in the vasculature through aldosterone-[31] or TXNIP-induced NLRP3 activation[88,89]. Also, NLRP3 increased activity in the endothelium synergizes with hyperlipidemia to cause a topographic distribution of atherosclerotic lesions[90]. Considering that GCβ is stimulated by NO, the reduction of its expression might be due to the decrease in eNOS activity.

In summary, our study shows that NLRP3 has a dual role in mice CC relaxation *in vitro*, with its inhibition leading to impairment of nitric oxide-mediated relaxation, while its activation by LPS + ATP causes decreased cavernosal smooth muscle sensitivity to NO and endothelium-dependent relaxation. Therefore, NLRP3 may represent a novel target to modulate erectile function.

Received: 2 August 2018; Accepted: 18 October 2019;
Published online: 07 November 2019

References

1. Udelson, D. Biomechanics of male erectile function. *Journal of the Royal Society, Interface* **4**, 1031–1047, https://doi.org/10.1098/rsif.2007.0221 (2007).
2. Costa, W. S., Carrerete, F. B., Horta, W. G. & Sampaio, F. J. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU international* **97**, 567–569, https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05917.x (2006).
3. Saenz de Tejada, I. *et al.* Physiology of erectile function. *The journal of sexual medicine* **1**, 254–265, https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.04038.x (2004).
4. Priviero, F. B., Leite, R., Webb, R. C. & Teixeira, C. E. Neurophysiological basis of penile erection. *Acta pharmacologica Sinica* **28**, 751–755, https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00584.x (2007).
5. Dean, R. C. & Lue, T. F. Neuroregenerative strategies after radical prostatectomy. *Reviews in urology* **7**(Suppl 2), S26–32 (2005).
6. Ritchie, R. & Sullivan, M. Endothelins & erectile dysfunction. *Pharmacological research* **63**, 496–501, https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.12.006 (2011).
7. Giuliano, F. & Rampin, O. Neural control of erection. *Physiology & behavior* **83**, 189–201, https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.08.014 (2004).
8. Blans, M. C. *et al.* Infection induced inflammation is associated with erectile dysfunction in men with diabetes. *European journal of clinical investigation* **36**, 497–502, https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2006.01653.x (2006).
9. Arana Rosainz Mde, J. *et al.* Imbalanced low-grade inflammation and endothelial activation in patients with type 2 diabetes mellitus and erectile dysfunction. *The journal of sexual medicine* **8**, 2017–2030, https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2011.02277.x (2011).
10. Rodrigues, F. L., Fais, R. S., Tostes, R. C. & Carneiro, F. S. There is a link between erectile dysfunction and heart failure: it could be inflammation. *Current drug targets* **16**, 442–450 (2015).
11. Stallmann-Jorgensen, I., Ogbi, S., Szasz, T. & Webb, R. C. A Toll-Like Receptor 1/2 Agonist Augments Contractility in Rat Corpus Cavernosum. *The journal of sexual medicine* **12**, 1722–1731, https://doi.org/10.1111/jsm.12960 (2015).
12. Nunes, K. P., Bomfim, G. F., Toque, H. A., Szasz, T. & Clinton Webb, R. Toll-like receptor 4 (TLR4) impairs nitric oxide contributing to Angiotensin II-induced cavernosal dysfunction. *Life sciences* **191**, 219–226, https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.10.014 (2017).
13. Zuo, Z. *et al.* Effect of periodontitis on erectile function and its possible mechanism. *The journal of sexual medicine* **8**, 2598–2605, https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2011.02361.x (2011).
14. Oh, J. S. *et al.* The effect of anti-tumor necrosis factor agents on sexual dysfunction in male patients with ankylosing spondylitis: a pilot study. *International journal of impotence research* **21**, 372–375, https://doi.org/10.1038/ijir.2009.44 (2009).
15. Alkan, E. *et al.* Role of endothelin receptors and relationship with nitric oxide synthase in impaired erectile response in diabetic rats. *Andrologia* **49**, https://doi.org/10.1111/and.12607 (2017).
16. Carneiro, F. S. *et al.* TNF-alpha knockout mice have increased corpora cavernosa relaxation. *The journal of sexual medicine* **6**, 115–125, https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01029.x (2009).

17. Carneiro, F. S., Webb, R. C. & Tostes, R. C. Emerging role for TNF-alpha in erectile dysfunction. *The journal of sexual medicine* **7**, 3823–3834, https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01762.x (2010).
18. Carneiro, F. S. *et al.* TNF-alpha infusion impairs corpora cavernosa reactivity. *The journal of sexual medicine* **6**(Suppl 3), 311–319, https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01189.x (2009).
19. Wu, F. *et al.* Aldosterone induces inflammatory cytokines in penile corpus cavernosum by activating the NF-kappaB pathway. *Asian journal of andrology*, https://doi.org/10.4103/aja.aja_8_17 (2017).
20. Mariathasan, S. A. S. C. Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes and infection* **9**, 664–671, https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.017 (2007).
21. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* **27**, 229–265, https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715 (2009).
22. Bauernfeind, F. G. *et al.* Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology* **183**, 787–791, https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363 (2009).
23. Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* **9**, 847–856, https://doi.org/10.1038/ni.1631 (2008).
24. Hoffman, H. M. & Brydges, S. D. Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease. *The Journal of biological chemistry* **286**, 10889–10896, https://doi.org/10.1074/jbc.R110.135491 (2011).
25. Mariathasan, S. & Monack, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **7**, 31–40, https://doi.org/10.1038/nri1997 (2007).
26. Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D. A. & Tschopp, J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Current opinion in immunology* **19**, 615–622, https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.09.002 (2007).
27. Vilaysane, A. *et al.* The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* **21**, 1732–1744, https://doi.org/10.1681/ASN.2010020143 (2010).
28. Kawaguchi, M. *et al.* Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **123**, 594–604, https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982777 (2011).
29. Yin, Y. *et al.* Inflammasomes: sensors of metabolic stresses for vascular inflammation. *Front Biosci (Landmark Ed)* **18**, 638–649 (2013).
30. Komada, T. *et al.* ASC in renal collecting duct epithelial cells contributes to inflammation and injury after unilateral ureteral obstruction. *The American journal of pathology* **184**, 1287–1298, https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.014 (2014).
31. Bruder-Nascimento, T. *et al.* NLRP3 Inflammasome Mediates Aldosterone-Induced Vascular Damage. *Circulation* **134**, 1866–1880, https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024369 (2016).
32. Coll, R. C. *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature medicine* **21**, 248–255, https://doi.org/10.1038/nm.3806 (2015).
33. da Costa, R. M. *et al.* Increased O-GlcNAcylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Compromises the Anti-contractile Properties of Perivascular Adipose Tissue in Metabolic Syndrome. *Frontiers in physiology* **9**, 341, https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00341 (2018).
34. Schultz, K., Murthy, V., Tatro, J. B. & Beasley, D. Endogenous interleukin-1 alpha promotes a proliferative and proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **292**, H2927–2934, https://doi.org/10.1152/ajpheart.00700.2006 (2007).
35. Foldes, G. *et al.* Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells. *PloS one* **5**, e10501, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010501 (2010).
36. Tousoulis, D., Andreou, I., Antoniades, C., Tentolouris, C. & Stefanadis, C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* **201**, 236–247, https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.034 (2008).
37. Hu, C. *et al.* NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 11318–11323, https://doi.org/10.1073/pnas.1513509112 (2015).
38. Inoue, Y. *et al.* NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. *Journal of immunology* **192**, 4342–4351, https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302039 (2014).
39. Baumann, F. *et al.* Erectile dysfunction - overview from a cardiovascular perspective. *VASA. Zeitschrift fur Gefasskrankheiten* **46**, 347–353, https://doi.org/10.1024/0301-1526/a000627 (2017).
40. Vlachopoulos, C. *et al.* Unfavourable endothelial and inflammatory state in erectile dysfunction patients with or without coronary artery disease. *European heart journal* **27**, 2640–2648, https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl341 (2006).
41. Rodrigues, F. L. *et al.* Toll-like receptor 9 plays a key role in the autonomic cardiac and baroreflex control of arterial pressure. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **308**, R714–723, https://doi.org/10.1152/ajpregu.00150.2014 (2015).
42. Yao, Y. *et al.* Anti-Connective Tissue Growth Factor Detects and Reduces Plaque Inflammation in Early-Stage Carotid Atherosclerotic Lesions. *Nanomedicine*, https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.07.016 (2017).
43. Ortega-Hernandez, J. *et al.* Acute coronary syndrome and acute kidney injury: role of inflammation in worsening renal function. *BMC cardiovascular disorders* **17**, 202, https://doi.org/10.1186/s12872-017-0640-0 (2017).
44. Liu, Z. *et al.* Curcumin Protects against Ischemic Stroke by Titrating Microglia/Macrophage Polarization. *Frontiers in aging neuroscience* **9**, 233, https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00233 (2017).
45. Mann, D. L. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circulation research* **108**, 1133–1145, https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226936 (2011).
46. Nomura, J., So, A., Tamura, M. & Busso, N. Intracellular ATP Decrease Mediates NLRP3 Inflammasome Activation upon Nigericin and Crystal Stimulation. *Journal of immunology* **195**, 5718–5724, https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402512 (2015).
47. Jo, E. K., Kim, J. K., Shin, D. M. & Sasakawa, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology* **13**, 148–159, https://doi.org/10.1038/cmi.2015.95 (2016).
48. Man, S. M. *et al.* Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 7403–7408, https://doi.org/10.1073/pnas.1402911111 (2014).
49. Lorenz, G., Darisipudi, M. N. & Anders, H. J. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **29**, 41–48, https://doi.org/10.1093/ndt/gft332 (2014).
50. Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A. & Kolodner, R. D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nature genetics* **29**, 301–305, https://doi.org/10.1038/ng756 (2001).
51. Di Pietro, M., Filardo, S., Falasca, F., Turriziani, O. & Sessa, R. Infectious Agents in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases through Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences* **18**, https://doi.org/10.3390/ijms18112459 (2017).
52. Raines, E. W. & Ferri, N. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *Journal of lipid research* **46**, 1081–1092, https://doi.org/10.1194/jlr.R500004-JLR200 (2005).

53. Liu, P. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome induces vascular dysfunction in obese OLETF rats. *Biochemical and biophysical research communications* **468**, 319–325, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.105 (2015).
54. Satoh, M., Tabuchi, T., Itoh, T. & Nakamura, M. NLRP3 inflammasome activation in coronary artery disease: results from prospective and randomized study of treatment with atorvastatin or rosuvastatin. *Clinical science* **126**, 233–241, https://doi.org/10.1042/CS20130043 (2014).
55. Haneklaus, M. & O'Neill, L. A. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunological reviews* **265**, 53–62, https://doi.org/10.1111/imr.12285 (2015).
56. Krishnan, S. M. *et al.* Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *British journal of pharmacology* **173**, 752–765, https://doi.org/10.1111/bph.13230 (2016).
57. De Miguel, C., Rudemiller, N. P., Abais, J. M. & Mattson, D. L. Inflammation and hypertension: new understandings and potential therapeutic targets. *Current hypertension reports* **17**, 507, https://doi.org/10.1007/s11906-014-0507-z (2015).
58. Zheng, F., Xing, S., Gong, Z. & Xing, Q. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis. *Heart, lung & circulation* **22**, 746–750, https://doi.org/10.1016/j.hlc.2013.01.012 (2013).
59. Sharma, A. *et al.* Oxidative Stress and NLRP3-Inflammasome Activity as Significant Drivers of Diabetic Cardiovascular Complications: Therapeutic Implications. *Frontiers in physiology* **9**, 114, https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00114 (2018).
60. Engin, A. Endothelial Dysfunction in Obesity. *Advances in experimental medicine and biology* **960**, 345–379, https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_15 (2017).
61. Vandanmagsar, B. *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine* **17**, 179–188, https://doi.org/10.1038/nm.2279 (2011).
62. Sprague, A. H. & Khalil, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical pharmacology* **78**, 539–552, https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.029 (2009).
63. Kofler, S., Nickel, T. & Weis, M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clinical science* **108**, 205–213, https://doi.org/10.1042/CS20040174 (2005).
64. Lim, S. & Park, S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB reports* **47**, 1–7 (2014).
65. Ren, X. S. *et al.* NLRP3 Gene Deletion Attenuates Angiotensin II-Induced Phenotypic Transformation of Vascular Smooth Muscle Cells and Vascular Remodeling. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **44**, 2269–2280, https://doi.org/10.1159/000486061 (2017).
66. Pellegrini, C., Antonioli, L., Lopez-Castejon, G., Blandizzi, C. & Fornai, M. Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation. *Frontiers in immunology* **8**, 36, https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00036 (2017).
67. Vanaja, S. K., Rathinam, V. A. & Fitzgerald, K. A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in cell biology* **25**, 308–315, https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.009 (2015).
68. Eldridge, M. J. & Shenoy, A. R. Antimicrobial inflammasomes: unified signalling against diverse bacterial pathogens. *Current opinion in microbiology* **23**, 32–41, https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.10.008 (2015).
69. Kayagaki, N. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117–121, https://doi.org/10.1038/nature10558 (2011).
70. Musicki, B. & Burnett, A. L. eNOS function and dysfunction in the penis. *Experimental biology and medicine* **231**, 154–165 (2006).
71. Arnal, J. F., Dinh-Xuan, A. T., Pueyo, M., Darblade, B. & Rami, J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **55**, 1078–1087 (1999).
72. Andersson, K. E. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. *Pharmacological reviews* **63**, 811–859, https://doi.org/10.1124/pr.111.004515 (2011).
73. Yafi, F. A. *et al.* Erectile dysfunction. *Nature reviews. Disease primers* **2**, 16003, https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.3 (2016).
74. Liu, S., Adcock, I. M., Old, R. W., Barnes, P. J. & Evans, T. W. Lipopolysaccharide treatment *in vivo* induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochemical and biophysical research communications* **196**, 1208–1213 (1993).
75. Kang, D. G. *et al.* Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose (PGG) via a nitric oxide-cGMP pathway. *European journal of pharmacology* **524**, 111–119, https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.08.061 (2005).
76. Lima, F. O. *et al.* Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway. *Pain* **151**, 506–515, https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.08.014 (2010).
77. Hernandez-Cuellar, E. *et al.* Cutting edge: nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *Journal of immunology* **189**, 5113–5117, https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202479 (2012).
78. Imai, Y. *et al.* Interaction between cytokines and inflammatory cells in islet dysfunction, insulin resistance and vascular disease. *Diabetes, obesity & metabolism* **15**(Suppl 3), 117–129, https://doi.org/10.1111/dom.12161 (2013).
79. Tong, Y. C., Broderick, G., Hypolite, J. & Levin, R. M. Correlations of purinergic, cholinergic and adrenergic functions in rabbit corporal cavernosal tissue. *Pharmacology* **45**, 241–249, https://doi.org/10.1159/000139007 (1992).
80. Wu, H. Y., Broderick, G. A., Suh, J. K., Hypolite, J. A. & Levin, R. M. Effects of purines on rabbit corpus cavernosum contractile activity. *International journal of impotence research* **5**, 161–167 (1993).
81. Filippi, S., Amerini, S., Maggi, M., Natali, A. & Ledda, F. Studies on the mechanisms involved in the ATP-induced relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. *The Journal of urology* **161**, 326–331 (1999).
82. Tostes, R. C. *et al.* Determination of adenosine effects and adenosine receptors in murine corpus cavernosum. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **322**, 678–685, https://doi.org/10.1124/jpet.107.122705 (2007).
83. Carneiro, F. S. *et al.* Adenosine actions are preserved in corpus cavernosum from obese and type II diabetic db/db mouse. *The journal of sexual medicine* **5**, 1156–1166, https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2007.00752.x (2008).
84. Yao, S. Y., Ljunggren-Rose, A., Chandramohan, N., Whetsell, W. O. Jr. & Sriram, S. *In vitro* and *in vivo* induction and activation of nNOS by LPS in oligodendrocytes. *Journal of neuroimmunology* **229**, 146–156, https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.07.023 (2010).
85. Harada, S., Imaki, T., Chikada, N., Naruse, M. & Demura, H. Distinct distribution and time-course changes in neuronal nitric oxide synthase and inducible NOS in the paraventricular nucleus following lipopolysaccharide injection. *Brain research* **821**, 322–332 (1999).
86. Javeshghani, D. & Magder, S. Regional changes in constitutive nitric oxide synthase and the hemodynamic consequences of its inhibition in lipopolysaccharide-treated pigs. *Shock* **16**, 232–238 (2001).
87. Comini, L. *et al.* Effects of endotoxic shock on neuronal NOS and calcium transients in rat cardiac myocytes. *Pharmacological research* **51**, 409–417, https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.11.001 (2005).
88. Li, Y. *et al.* Ilexgenin A inhibits endoplasmic reticulum stress and ameliorates endothelial dysfunction via suppression of TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in an AMPK dependent manner. *Pharmacological research* **99**, 101–115, https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.012 (2015).
89. Sun, X. *et al.* Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochemical and biophysical research communications* **481**, 63–70, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.017 (2016).
90. Xiao, H. *et al.* Sterol regulatory element binding protein 2 activation of NLRP3 inflammasome in endothelium mediates hemodynamic-induced atherosclerosis susceptibility. *Circulation* **128**, 632–642, https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002714 (2013).

Author contributions

(a) Conception and Design Rafael S. Fais; Fernando S. Carneiro. (b) Acquisition of Data. Western Blot: Rafael S. Fais, Allan C. Mendes, Fabíola Mestriner. Reactivity: Rafael S. Fais, Camila A Pereira. (c) Analysis and Interpretation of Data Rafael S. Fais, Fernanda L Rodrigues, Fernando S. Carneiro. (d) Drafting the Article Rafael S. Fais, Fernando S. Carneiro. (e) Revising It for Intellectual Content Rafael S. Fais, Fernando S. Carneiro, Rita C. Tostes. (f) Final Approval of the Completed Article Fernando S. Carneiro, Rita C. Tostes.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-52831-0.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.S.C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019