UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Papel do inflamassoma NLRP3 nas alterações vasculares promovidas pelo diabetes tipo 1 em modelo induzido por estreptozotocina

CAMILA ANDRÉ PEREIRA

Ribeirão Preto

2018

CAMILA ANDRÉ PEREIRA

Papel do inflamassoma NLRP3 nas alterações vasculares promovidas pelo diabetes tipo 1 em modelo induzido por estreptozotocina

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Co-orientadora: Dra. Daniela Carlos Sartori

Ribeirão Preto

2018

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.

Pereira, Camila André
Papel do inflamassoma NLRP3 nas alterações vasculares promovidas pelo diabetes tipo 1 em modelo induzido por estreptozotocina; orientadora Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia; co-orientadora Daniela Carlos Sartori. - 2018
119 p.: il.; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. Área de concentração: Farmacologia.

1.Diabetes tipo 1. 2.Disfunção endotelial. 3. Inflamassoma NLRP3. 4. DNA mitocondrial

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Camila André Pereira

Título: Papel do inflamassoma NLRP3 nas alterações vasculares promovidas pelo diabetes tipo 1 em modelo induzido por estreptozotocina.

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.ª. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia
Co-orientadora: Dra. Daniela Carlos Sartori

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus queridos mestres e professores, fonte de inspiração, de força, de luta e de fé!

Agradecimentos

Durante esta caminhada muitas pessoas contribuíram para a realização deste trabalho e as quais eu sou imensamente grata.

Gostaria de agradecer à Prof.ª Rita Tostes, minha orientadora, que sempre com todo o carinho me motivou, me guiou, tanto nas questões científicas quanto pessoais, a concluir este trabalho. Me ensinou a me inspirar nas coisas boas que cada pessoa tem em si.

À Dra. Daniela Carlos, pela co-orientação, a qual foi fundamental para que pudéssemos desenvolver com maior clareza a parte "imunológica" deste trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus companheiros de laboratório, Karla Bianca, Rhéure, Camila Zanotto, Nathanne, Pedro, Rafael Menezes, Rafael Fais, Julio, Thiago Dias, Juliano, Aline, Allan, Fernanda Rodrigues, Josiane, Diane, Emiliana, Sara, Fernanda, Daniel, Isabela e Juliana pela ajuda de sempre, pelas contribuições científicas e por tornar nosso lab um lugar muito agradável para se trabalhar.

Ao Stefany Cau, Marcondes, Vania Olivon e Thiago Bruder que enquanto pós-docs do nosso lab, me ajudaram imensamente.

Às técnicas de laboratório Carla Pavan, Fabíola Mestriner e Giuliana por tornar possível a realização dos experimentos com a sempre boa conduta de funcionamento do nosso lab e também pelo carinho e amizade.

Ao professor Fernando Carneiro, pela também ajuda científica e pessoal, me inspirando a crescer e acreditar nas minhas capacidades.

Aos demais técnicos do departamento de farmacologia, que sempre foram solícitos nos momentos em que precisei.

À Eliana, técnica do biotério, por seu trabalho de cuidar e nos ensinar a cuidar dos animais utilizados em nosso trabalho.

Às secretárias Sônia, Fátima e Gislaine, e ao Ramon que sempre me auxiliaram nas questões burocráticas e regras da pós-graduação, no cumprimento de normas e prazos do dia-a-dia do departamento.

À Dra. Valéria Duarte Garcia e à Prof.ª Dra. Dora Selma Fix Ventura pela colaboração com as amostras de pacientes diabéticos, o que enriqueceu nosso trabalho e o tornou mais translacional.

À minha família querida, que sempre me apoiou em todas as decisões que tive de tomar, me deu forças, me deu amor, me deu aconchego, e tudo mais que precisei nesta jornada até aqui.

Ao Hugo, pelo amor e companheirismo, por estar comigo nos momentos felizes e nos não felizes também; seu amor me faz ser melhor!

E um agradecimento às pessoas que tenha esquecido de citar o nome, mas que sei que em alguma parte desse processo me ajudaram na realização e conclusão deste trabalho.

À Deus, pela oportunidade da vida, de estar sempre no lugar certo, com as pessoas certas!!!

Ao apoio financeiro da CAPES e da FAPESP (2016/17303-4).

"Há um ditado chinês que diz: se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando um pão, e, ao se encontrarem, eles trocarem os pães, cada um irá embora com um. Porém, se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando uma idéia e, ao se encontrarem, trocarem as idéias; cada um irá embora com duas.

Quem sabe, é esse mesmo o sentido do nosso fazer: repartir idéias, para todos terem pão..."

Mario Sergio Cortella

RESUMO

PEREIRA, C.A. **Papel do inflamassoma NLRP3 nas alterações vasculares promovidas pelo diabetes tipo 1 em modelo induzido por estreptozotocina**. 119 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O diabetes mellitus (DM) está associado a diversas complicações micro e macrovasculares diretamente relacionadas a doenças cardiovasculares. A prolongada exposição à hiperglicemia e a resistência a insulina são considerados os principais fatores envolvidos nestas complicações, as quais são exacerbadas pela disfunção endotelial. Mediadores inflamatórios contribuem potencialmente para o desenvolvimento de disfunção endotelial pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, estimulam a transcrição de fatores pró-inflamatórios. Receptores específicos, como os NLRs (NOD-*like receptors*, receptores do tipo NOD) contribuem para instalação de processo inflamatório pela ativação do complexo inflamassoma. Este regula a ativação da caspase-1 e o processamento proteolítico dos precursores pró-IL-1β e pró-IL-18 nas citocinas maduras. Diversos mediadores podem ativar o inflamassoma NLRP3 como, por exemplo, EROs e DNA mitocondrial. Pouco é conhecido sobre o envolvimento de receptores NLRP3 e DNA mitocondrial na disfunção endotelial associada ao diabetes. Testamos a hipótese que a deficiência genética do receptor NLRP3 confere resistência à ativação de processo inflamatório na vasculatura de animais com diabetes tipo 1 (DM1) e, ainda, que DNA mitocondrial contribui para a ativação vascular do inflamassoma NLRP3 e para disfunção endotelial. Foram utilizados camundongos C57Bl/6 e deficientes para NLRP3, os quais foram tratados com veículo ou submetidos a protocolo para indução de DM1 com estreptozotocina. Parâmetros vasculares funcionais foram determinados em artérias mesentéricas de resistência. Células de músculo liso vascular (CMLV) e endoteliais foram utilizadas para avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 por DNA mitocondrial. A geração de EROs foi avaliada pela fluorescência para o dihidroetídio e pela quimiluminescência para lucigenina. A ativação de caspase-1 e IL-1β foi avaliada por western blot e o influxo de cálcio, por fluorescência. DNA mitocondrial foi avaliado pela expressão gênica de componentes da mitocôndria. O diabetes reduziu a vasodilatação dependente de endotélio, o que não ocorreu em artérias de animais deficientes de NLRP3. Animais diabéticos apresentaram aumento da expressão vascular do receptor NLRP3, da ativação de caspase-1 e

IL-1β e da geração de EROs e peróxido de hidrogênio no leito mesentérico, eventos que ocorreram em menor intensidade em camundongos deficientes de NLRP3. Houve redução na expressão proteica vascular de Nox4 (*NADPH oxidase 4*), bem como na expressão gênica da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*) em animais deficientes de NLRP3. Houve aumento da liberação de DNA mitocondrial citosólico no pâncreas de animais diabéticos. A incubação com o DNA mitocondrial extraído do pâncreas de animais diabéticos promoveu ativação do inflamassoma em CMLV provenientes de animais C57Bl/6, mas não em CMLV provenientes de animais deficientes de NLRP3. Esta ativação foi associada ao aumento de EROs e influxo de cálcio. Essa mesma ativação também foi observada em células endoteliais. DNA mitocondrial de camundongos diabéticos também reduziu a dilatação dependente do endotélio em artérias mesentéricas, o que foi associado à geração de EROs e ativação do inflamassoma NLRP3. Pacientes diabéticos apresentaram aumento do DNA mitocondrial circulante e ativação de caspase-1 e IL-1β no soro. Os resultados demonstram que o DNA mitocondrial pancreático de animais diabéticos promove ativação, em CMLV e células endoteliais, do inflamassoma NLRP3 através do aumento no influxo de cálcio e da geração de EROs, contribuindo para o processo de disfunção endotelial. A deficiência de NLRP3 protege os animais diabéticos contra os danos vasculares inflamatórios e disfunção endotelial.

Palavras-chave: diabetes tipo 1, disfunção endotelial, inflamassoma NLRP3, DNA mitocondrial

ABSTRACT

PEREIRA, C.A. **Role of the NLRP3 inflammasome in the vascular alterations induced by type 1 diabetes in a streptozotocin-induced model.** 2018. 119 p. Thesis (Ph.D. in Pharmacology) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2018.

Diabetes mellitus (DM) is associated with several micro and macrovascular complications directly related to cardiovascular diseases. Prolonged exposure to hyperglycemia and insulin resistance are considered the main factors involved in these complications, which are exacerbated by endothelial dysfunction. Inflammatory mediators potentially contribute to the development of endothelial dysfunction by the generation of reactive oxygen species (ROS), which, in turn, stimulate the transcription of pro-inflammatory factors. Specific receptors such as NLRs (NOD-like receptors) contribute to the onset of inflammatory processes by the activation of a multiprotein complex called inflammasome. The NLRP3 inflammasome regulates the activation of caspase-1 and the proteolytic processing of pro-IL-1β and pro-IL-18 precursors into mature cytokines. Several mediators, such as ROS and mitochondrial DNA activate the NLRP3 inflammasome. Considering that it is not clear whether NLRP3 and mitochondrial DNA contribute to diabetes-associated endothelial dysfunction, we hypothesized that the genetic deficiency of the NLRP3 confers resistance to vascular inflammatory processes in animals with type 1 diabetes (T1D) and that mitochondrial DNA contributes to vascular activation of NLRP3 inflammasome and endothelial dysfunction. C57B1/6 and NLRP3 knockout mice were treated with vehicle or streptozotocin to induce T1D. Functional vascular parameters were determined in resistance mesenteric arteries. Cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) and endothelial cells were used to determine NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial DNA. ROS generation was evaluated by dihydroethidium fluorescence and by chemiluminescence for lucigenin. Caspase-1 and IL-1β activation was evaluated by western blot. Calcium influx was determined by fluorescence and mitochondrial DNA by mRNA expression of mitochondrial components. Diabetes reduced endothelium-dependent vasodilation in C57B1/6, but not in NLRP3 knockout mice. Diabetic mice presented increased vascular NLRP3 receptor expression, increased caspase-1 and IL-1β activation, as well as ROS and hydrogen peroxide generation, events that were mildly observed in NLRP3 knockout mice. There was a reduction in the vascular protein expression of Nox4 (NADPH oxidase 4) as well

as in the gene expression of VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) in NLRP3 knockout animals. There was an increase in cytosolic mitochondrial DNA release in pancreas from diabetic animals. Mitochondrial DNA from the pancreas of diabetic mice induced NLRP3 inflammasome activation in VSMC from C57B1/6 mice, but not in VSMC from NLRP3 knockout mice. This activation was associated with increased levels of ROS and calcium influx and was also detected in endothelial cells. Mitochondrial DNA from diabetic mice also decreased endothelium-dependent dilation in mesenteric arteries, which was associated with ROS generation and NLRP3 inflammasome activation. Diabetic patients exhibited increased serum mitochondrial DNA and caspase-1 and IL-1β activation. The results demonstrate that pancreatic mitochondrial DNA from diabetic mice activates the NLRP3 inflammasome in VSMC and endothelial cells by increasing calcium influx and ROS generation, contributing to endothelial dysfunction. NLRP3 deficiency prevents diabetes-related vascular inflammatory damage and endothelial dysfunction.

Keywords: type 1 diabetes, endothelial dysfunction, NLRP3 inflammasome, mitochondrial DNA

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar
µmol	micromol
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
ADA	Associação Americana de Diabetes
AGEs	produtos finais da glicação avançada
Akt	proteína quinase B
Ang II	angiotensina II
ANOVA	análise de variância
ASC	proteína partícula-símile associada à apoptose
ATP	adenosina trifosfato
AUC	área sob a curva
BH_4	tetraidrobiopterina
BSA	albumina de soro bovino
Ca^{2+}	cálcio
$CaCl_2$	cloreto de cálcio
CARD	domínio N-terminal de recrutamento de caspase
CCL5	ligante de quimiocina 5
CCR5	receptor de quimiocina tipo 5
CD4	grupamento de diferenciação 4
CD8	grupamento de diferenciação 8
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMLV	células de músculo liso vascular
CO_2	dióxido de carbono

Ct	ciclo threshold
CXCL10	ligante de quimiocina CXC tipo 10
CXCR3	receptor de quimiocina CXC tipo 3
DAMPs	padrões moleculares associados ao dano tecidual
DEPC	dicarbonato de dietila
DHE	di-hidroetídio
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes tipo 1
DM2	diabetes tipo 2
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAm	DNA mitocondrial
DNAmc	DNA mitocondrial de animais controle
DNAmd	DNA mitocondrial de animais diabéticos
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTPA	ácido dietilenotriaminopentacético
E.P.M.	erro padrão da média
EC50	concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo
EDCF	fatores contráteis derivados do endotélio
EDH	hiperpolarização derivada do endotélio
EDHF	fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
EGTA	ácido tetra acético etileno glicol
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
Erk1/2	quinase regulada por sinal extracelular
EROs	espécies reativas de oxigênio

ET-1	endotelina-1
FE	fenilefrina
g	grama
GAPDH	glicerol-3-fosfato desidrogenase
Glut4	transportador de glicose 4
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HUVECs	células endoteliais da veia umbilical humana
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IFN-γ	interferon gama
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-18	interleucina 18
IL-1R	receptor de interleucina 1
IL-1β	interleucina-1 beta
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
JNK	quinases N-terminais c-Jun
K^+	potássio
KCl	cloreto de potássio
KH_2PO_4	fosfato monobásico de potássio
kPa	quilopascal
LDL	lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	L-arginina metil éster
LPS	lipopolissacarídeo
LRR	região C-terminal de repetições ricas em leucina
M	molar
MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1/CCL2	proteína 1 quimiotática de monócitos

mg	miligrama
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
$MgSO_4$	sulfato de magnésio
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mN	milinewton
NaCl	cloreto de sódio
NACTH	domínio central comum
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaH_2PO_4	fosfato de sódio monobásico
$NaHCO_3$	bicarbonato de sódio
NF-κB	fator nuclear kappa B
NLR	receptores do tipo NOD
NO	óxido nítrico
Nox2	NADPH oxidase 2
Nox4	NADPH oxidase 4
NPS	nitroprussiato de sódio
O_2^-	ânion superóxido
O_2	oxigênio
OLEF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PCR	reação em cadeia de polimerase
pD2	logaritmo negativo da concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo
PI3K	quinase de fosfoinositídeos na posição 3
PKC	proteína quinase C
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil

PPARγ	receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PYR	domínio pirina
Rmáx	resposta máxima
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
STZ	estreptozotocina
Th1	linfócitos T helper 1
Tiron	4,5-dihidroxi- ácido 1,3-benzenodisulfonico dissódico monohidradato
TLR-2	receptor do tipo Toll 2
TLR-4	receptor do tipo Toll 4
TLRs	receptores do tipo Toll
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
U	unidade
URF	unidade relativa de fluorescência
URL	unidade relativa de luminescência
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular-1
WT	tipo selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mediadores da disfunção endotelial no diabetes. 29
Figura 2 Representação esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3. 33
Figura 3 Representação esquemática da hipótese do trabalho 38
Figura 4 Período de tratamento para indução do DM1 e dos protocolos experimentais com soro e tecidos de camundongos WT e deficientes de NLRP3. 43
Figura 5 Delineamento experimental dos protocolos de reatividade vascular. 45
Figura 6 Delineamento experimental dos protocolos de reatividade vascular com DNA mitocondrial. 48
Figura 7 Delineamento experimental dos protocolos de estimulação de CMLV com DNAm. 50
Figura 8 Delineamento experimental dos protocolos de estimulação de células endoteliais com DNAm 51
Figura 9 Massa corporal (g), glicemia (mg/dL) e insulina (µlU/ml) de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) por 15 dias. 61
Figura 10 Curvas concentração-resposta para fenilefrina (FE), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) 62
Figura 11 Curvas concentração-resposta para insulina em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1), antes e após incubação com L-NAME (10^{-4} M) 64
Figura 12 Expressão de NLRP3 e formas pró e clivada de caspase-1 e IL-1β no leito arterial mesentérico de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) 65
Figura 13 Massa corporal (g), glicemia (mg/dL) e níveis de insulina (µlU/ml) em camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) 66
Figura 14 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) e em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) antes e após a incubação com MCC950 (10^{-6} M) 67
Figura 15 Curvas concentração-resposta para insulina em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1), antes e após a incubação com L-NAME (10^{-4} M) 68
Figura 16 Expressão vascular de caspase-1 e IL-1β nas suas formas pró e clivada no leito arterial mesentérico de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) 70

Figura 17 Geração de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no leito mesentérico de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) 71

Figura 18 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1), antes e após incubação com Tiron (10^{-4} M) e peg-catalase (200 U/ml)..... 72

Figura 19 Geração de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no leito mesentérico de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) 73

Figura 20 Expressão de NOX-1, NOX-4, SOD-1 e catalase no leito arterial mesentérico de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) 74

Figura 21 Expressão gênica de VCAM-1 e ICAM-1 no leito mesentérico de animais C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) 75

Figura 22 Quantificação dos genes do DNA mitocondrial, NADH desidrogenase (NADH), citocromo B (Cit B) e citocromo C (Cit C) na fração citosólica de células do pâncreas e fração citosólica do leito mesentérico de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1)..... 76

Figura 23 Expressão de caspase-1 e IL-1β nas suas formas pró e clivada em CMLV incubadas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 µg/ml) na presença de veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd)..... 77

Figura 24 Expressão de caspase-1 nas suas formas pró e clivada em CMLV provenientes de camundongos deficientes de NLRP3 incubadas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 µg/ml) na presença de veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd) 78

Figura 25 Expressão de caspase-1 nas suas formas pró e clivada em CMLV incubadas com DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd) na presença de veículo e ODN 2088 (10 µg/ml) 79

Figura 26 Geração de ânion superóxido. Luminescência para lucigenina e fluorescência derivada de Dihidroetidio (DHE; 5 µM) em CMLV incubadas com DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd) na presença de veículo, Tiron (10^{-4} M) e CCCP (10^{-6} M)..... 80

Figura 27 Fluorescência para o influxo de Ca^{2+} em CMLV incubadas com veículo, DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd) e estimuladas com ATP (10^{-5} M) 81

Figura 28 Expressão vascular de BAX, BCl-2, VDAC e Cit C no leito arterial mesentérico de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1)..... 82

Figura 29 Expressão de caspase-1 e IL-1β nas suas formas pró e clivada em células endoteliais (Eahy926) incubadas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 µg/ml) na presença de veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd)..... 83
Figura 30 Luminescência para lucigenina em células endoteliais (Eahy926) incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd)..... 84
Figura 31 Fluorescência para o influxo de Ca^{2+} em células endoteliais (Eahy926) incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd) e estimuladas com ATP (10^{-5} M) 85
Figura 32 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd) 86
Figura 33 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais diabéticos (DNAmd) antes e após a incubação com Tiron (10^{-4} M) e CCCP (10^{-6} M)..... 87
Figura 34 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais diabéticos (DNAmd) na presença de veículo e MCC950 (10^{-6} M) 88
Figura 35 Níveis de 8-OHdG no DNA circulante, extraído do soro, e no DNAm extraído do pâncreas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) 89
Figura 36 Expressão de NLRP3, e formas pró e clivada de caspase-1 e IL-1β no soro de indivíduos não-diabéticos e diabéticos do tipo 1 90
Figura 37 Quantificação dos genes do DNA mitocondrial, NADH desidrogenase (NADH), citocromo B (Cit B) e citocromo C (Cit C) no soro de indivíduos não-diabéticos e diabéticos do tipo 1. 91
Figura 38 Representação esquemática da conclusão do trabalho..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 *Primers* utilizados 52

Tabela 2 Anticorpos utilizados 54

Tabela 3 Resposta Máxima e sensibilidade a FE, ACh e NPS em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) 63

Tabela 4 Resposta Máxima e sensibilidade a insulina em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1), antes e após incubação com L-NAME. 64

Tabela 5 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) e em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6, antes e após a incubação com MCC950 67

Tabela 6 Resposta Máxima e sensibilidade a insulina em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) antes e após a incubação com L-NAME 69

Tabela 7 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) antes e após incubação com Tiron ou Peg-catalase 72

Tabela 8 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente) 86

Tabela 9 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais diabéticos (DNAmd) antes e após a incubação com veículo ou Tiron e CCCP 87

Tabela 10 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais diabéticos (DNAmd) antes e após a incubação com veículo ou MCC950 88

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO 25

1.1. Diabetes Mellitus 25

1.2. Complicações agudas e crônicas no DM 26

1.3. Diabetes e disfunção endotelial 27

1.4. Diabetes tipo 1 e inflamação 29

1.5. Inflamassoma NLRP3 31

1.6. Inflamassoma NLRP3 e o diabetes 34

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE 38

3. OBJETIVO GERAL 40

3.1. Objetivos Específicos 40

4. MATERIAL E MÉTODOS 42

4.1. Pacientes 42

4.2. Animais 42

4.3. Indução de DM1 por STZ 42

4.4. Dosagem de insulina 43

4.5. Detecção dos níveis de 8-OHdG 43

4.6. Avaliação da função vascular 44

4.6.1. Preparação de Artéria Mesentérica Isolada 44

4.6.2. Protocolos experimentais 45

4.6.2.1. Avaliação da Resposta vasoconstritora à Fenilefrina (Fe) *46*

4.6.2.2. Avaliação da Resposta vasodilatadora à Acetilcolina (ACh) *46*

4.6.2.3. Avaliação da Resposta vasodilatadora ao Nitroprussiato de Sódio (NPS) *46*

4.6.2.4. Avaliação da Resposta vasodilatadora a insulina *46*

4.6.2.5. Contribuição do NO para a resposta vasodilatadora a insulina *46*

4.6.2.6. Contribuição do NLRP3 para a redução da resposta vasodilatadora à ACh . *46*

4.6.2.7. Contribuição do ânion superóxido (O_2^-) para a redução da resposta vasodilatadora à ACh *47*

4.6.2.8. Contribuição do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) para a redução da resposta vasodilatadora à ACh *47*

4.6.2.9. Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora à ACh *48*

4.6.2.10. Contribuição do O_2^- para a redução da resposta vasodilatadora à ACh induzida pelo DNA mitocondrial *48*

4.6.2.11. Contribuição de EROs mitocondriais para a redução da resposta vasodilatadora à ACh induzida pelo DNA mitocondrial *49*

4.6.2.12. Contribuição do NLRP3 para a redução da resposta vasodilatadora à ACh induzida pelo DNA mitocondrial *49*

4.7. Cultura de células de músculo liso vascular (CMLV) 49

4.8. Cultura da células endoteliais EAhy926 (ATCC® CRL-2922 ™) 50

4.9. Quantificação de DNA mitocondrial 51

4.10. Isolamento de DNA mitocondrial no pâncreas 52

4.11. Western Blot 53

4.11.1. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford 54

4.12. RT-PCR 55

4.13. Lucigenina 56

4.14. Amplex Red 57

4.15. DHE 58

4.16. Influxo de Cálcio 58

4.17. Drogas e sais utilizados 58

4.18. Análise estatística 59

5. RESULTADOS 61

5.1. Avaliação da massa corporal, glicemia e insulina 61

5.2. Avaliação das respostas vasoconstritora e vasodilatadora no diabetes 62

5.3. Avaliação da resposta vasodilatadora a insulina no diabetes 64

5.4. Avaliação da ativação vascular do inflamassoma NLRP3 no diabetes 65

5.5. Avaliação dos efeitos da deficiência do receptor NLRP3 sobre a massa corporal, glicemia e níveis de insulina 66

5.6. Avaliação da participação do inflamassoma na disfunção endotelial associada ao diabetes 67

5.7. Avaliação da participação do NLRP3 na redução da resposta vasodilatadora a insulina no diabetes 68

5.8. Avaliação da participação do NLRP3 na ativação vascular de caspase-1 e IL-1β 70

5.9. Avaliação da geração de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no diabetes 71

5.10. Avaliação da participação de O_2^- e H_2O_2 na disfunção endotelial associada ao diabetes 72

5.11. Avaliação da participação do NLRP3 na geração de O_2^- e H_2O_2 no diabetes 73

5.12. Avaliação da expressão vascular de NOX-1, NOX-4, SOD-1 e Catalase..... 74

5.13. Avaliação da participação do NLRP3 na expressão gênica de VCAM-1 e ICAM-1 75

5.14. Avaliação de DNA mitocondrial no citosol de células pancreáticas e mesentéricas 76

5.15. Avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 em células de músculo liso vascular (CMLV) por DNA mitocondrial 77

5.16. Avaliação da participação do NLRP3 na ativação de caspase-1 via DNAm em CMLV 78

5.17. Avaliação da participação do TLR-9 na ativação de caspase-1 via DNAm em CMLV 79

5.18. Avaliação da geração de EROs via DNAm em CMLV 80

5.19. Avaliação do efeito do DNA mitocondrial sobre o influxo de Ca^{2+} em CMLV.. 81

5.20. Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na apoptose no diabetes..... 82

5.21. Avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 pelo DNAm em células endoteliais 83

5.22. Avaliação da geração de EROs via DNAm em células endoteliais..... 84

5.23. Avaliação do efeito do DNAm sobre o influxo de Ca^{2+} em células endoteliais... 85

5.24. Avaliação do efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio 86

5.25. Avaliação da participação de EROs nos efeitos do DNAmd sobre a redução da resposta de relaxamento dependente do endotélio 87

5.26. Avaliação da participação do NLRP3 nos efeitos do DNAmd sobre a redução da resposta de relaxamento dependente do endotélio 88

5.27. Avaliação da oxidação do DNAm circulante e pancreático..... 89

5.28. Avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 no soro de pacientes diabéticos tipo 1 90

5.29. Avaliação do DNA mitocondrial circulante em pacientes diabéticos do tipo 1 . 91

6. DISCUSSÃO 93

7. CONCLUSÃO 103

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 105

ANEXO 119

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes Mellitus

Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF, *International Diabetes Federation*), de cada 11 adultos no mundo, 1 tem diabetes e, dentre estes, 1 em cada 2 adultos ainda não foi diagnosticado. Estes números tem aumentado ao longo dos anos, com a doença acometendo cerca de 425 milhões de pessoas em 2017, podendo atingir a marca de 629 milhões de pessoas em 2045. Mais impactantes são as mortes constatadas por diabetes, cerca de 4 milhões de pessoas em 2017, e os custos associados, os quais chegam a representar 20% dos gastos totais com saúde, causando um substancial impacto econômico mundial (Idf, 2017).

Infelizmente, no Brasil estes números não tem sido diferentes. Nosso país ocupa atualmente a 4ª posição no ranking mundial entre os 10 países com maior número de diabéticos e a 3ª posição quanto ao número de crianças com diabetes do tipo 1 (Idf, 2017). O número de pessoas diagnosticadas com diabetes no Brasil aumentou 61,8% nesta última década, passando de 5,5% para 8,9% em 2016 (Vigitel, 2017), representando um grande desafio de saúde pública.

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, lipídeos e proteínas, resultantes de deficiências na secreção ou ação da insulina, ou de ambas. Segundo a ADA (*American Diabetes Association*), o DM é classificado em 4 classes clínicas: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos específicos de diabetes.

O diabetes tipo 1 (DM1) é resultante da destruição autoimune das células β-pancreáticas ocasionando deficiência na secreção de insulina. Este tipo ocorre em 5 a 10% dos casos de diabetes, sendo sua maior incidência na infância e adolescência.

Já o diabetes tipo 2 (DM2) é resultante de um quadro de resistência a insulina e consequente hipersecreção compensatória, que precede o declínio da função secretora das ilhotas pancreáticas. É o tipo mais comum ocorrendo em 90% dos casos, sendo sua maior incidência em pessoas obesas acima dos 40 anos.

O diabetes gestacional é definido como qualquer grau de intolerância a glicose primeiramente reconhecida durante a gravidez, podendo causar retardo no crescimento fetal, partos traumáticos, hipoglicemia neonatal, obesidade e DM na fase adulta. Outros tipos

específicos de DM estão relacionados a defeitos genéticos da célula β ou da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, indução química ou por drogas, infecções, formas incomuns de DM imunomediadas e outras síndromes genéticas associadas.

Segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2017-2018) (Autores, 2018), o diagnóstico de DM baseia-se nos seguintes critérios:

a) glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl;
b) glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose > 200 mg/dl;
c) glicemia ≥ 200 com sintomas inequívocos de hiperglicemia;
d) hemoglobina glicada (hba1c) (%) ≥ 6,5.

1.2. Complicações agudas e crônicas no DM

O DM está associado a diversas complicações agudas e crônicas causando aumento da morbidade, da mortalidade e afetando a qualidade de vida dos pacientes (Sharma *et al.*, 1980; Bertoni *et al.*, 2002; Laing *et al.*, 2003).

As complicações agudas mais frequentes e associadas à maior mortalidade são os quadros de cetoacidose diabética, resultantes do estado de hiperglicemia (elevação dos níveis de glicose no sangue acima de 200 mg/dL), e o coma, nos casos de hipoglicemia (queda dos níveis de glicemia abaixo de 70 mg/dL).

As complicações crônicas do DM estão relacionadas aos danos funcionais e estruturais dos vasos sanguíneos e são classificadas em complicações micro e macrovasculares.

As complicações microvasculares são decorrentes dos danos em pequenos vasos sanguíneos como arteríolas, capilares e vênulas e, em pacientes diabéticos, estão associadas a problemas clínicos, como retinopatia, nefropatia e neuropatia. As complicações macrovasculares são aquelas decorrentes de danos nos grandes vasos, como as artérias e veias e, no diabetes, estão associadas a doença arterial coronariana, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral (Laing *et al.*, 2003).

As complicações micro e macrovasculares são induzidas por diversos mecanismos, dentre eles, a disfunção endotelial, decorrente de desequilíbrio na produção e regulação de fatores liberados pelo endotélio vascular (Taddei *et al.*, 1996; Jarvisalo *et al.*, 2004). A exposição

prolongada a hiperglicemia e a resistência à insulina levam à disfunção endotelial (Giacco e Brownlee, 2010; Folli *et al.*, 2011).

1.3. Diabetes e disfunção endotelial

A disfunção endotelial é uma característica de várias doenças cardiovasculares e metabólicas, incluindo a hipertensão arterial (Park *et al.*, 2001), a doença arterial coronariana (Monnink *et al.*, 2002), a insuficiência cardíaca congestiva (Landmesser *et al.*, 2002), a insuficiência renal crônica (Bolton *et al.*, 2001), a aterosclerose (Chan *et al.*, 2003), o DM1 (Beckman *et al.*, 2003a) e o DM2 (Rizzoni *et al.*, 2001).

A disfunção endotelial ocorre não somente durante o curso das doenças cardiovasculares, mas também no seu início. Cerca de 90% dos indivíduos diabéticos e pré-diabéticos com alto risco para o desenvolvimento de aterosclerose coronariana apresentam disfunção endotelial (Defronzo, 1988), sendo também um importante fator de risco para trombose e aterosclerose (Cersosimo e Defronzo, 2006).

Para entender os mecanismos associados à disfunção endotelial no diabetes é preciso entender como funciona o endotélio em tal condição. O endotélio desempenha um papel crucial na regulação do tônus vasomotor (Furchgott e Zawadzki, 1980) pela liberação de fatores vasoativos, mas também previne a agregação plaquetária e adesão de leucócitos e ainda regula a proliferação celular (Shi e Vanhoutte, 2017).

Dentre os fatores vasoativos, o óxido nítrico (NO) é considerado um dos maiores reguladores endoteliais locais do tônus vascular (Furchgott e Zawadzki, 1980; Furchgott *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1988; Vanhoutte, 1988). Esta molécula tem sua produção e biodisponibilidade afetadas nos estágios iniciais do diabetes. Estes efeitos na maioria das vezes estão associados a uma redução da expressão proteica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) (Paneni *et al.*, 2015), redução da fosforilação no sítio ativo (Serina^{1177}) ou aumento da fosforilação do sítio inibitório (Treonina^{495}) (Matsumoto *et al.*, 2014), diminuição do cofator essencial da eNOS, a tetraidrobiopterina (BH_4), aumento da atividade da L-arginase (Yao *et al.*, 2013; Pernow e Jung, 2016) e, ainda, aumento na produção de radicais livres derivados do oxigênio (Kikuchi *et al.*, 2014; Alves-Lopes *et al.*, 2016).

Além de reduzir a biodisponibilidade do NO, o diabetes também diminui a hiperpolarização derivada do endotélio (EDH, e*ndothelium-derived hyperpolarization*) (Matsumoto *et al.*, 2003; Coleman *et al.*, 2017), previamente associada a disponibilidade e ações dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) (Feletou e Vanhoutte, 2004; 2006; Garland e Dora, 2017; Leung e Vanhoutte, 2017).

Além de fatores vasodilatadores, o endotélio libera fatores de contração, ou fatores contráteis derivados do endotélio (EDCF, *endothelium-derived contracting factor*), como tromboxano A_2, prostaciclina e prostaglandinas H_2 e E_2. Alterações na liberação e ação destes fatores contribuem para a disfunção endotelial no diabetes (Vanhoutte e Tang, 2008). Há ainda aumento da síntese de outros vasoconstritores como a endotelina-1 (ET-1) (Geraldes e King, 2010) que induz contração vascular e contribui com a produção de EROs (Shi e Vanhoutte, 2009).

A geração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila está diretamente associada à hiperglicemia pelo aumento da auto-oxidação da glicose (Hunt *et al.*, 1988). O acúmulo de EROs, ou estresse oxidativo, promove aumento de produtos finais da glicação avançada (AGEs, *advanced glycation end-products*), o que aumenta a expressão de genes que codificam fatores pró-inflamatórios e pró-trombóticos (Fulop *et al.*, 2007) Os AGEs também promovem oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low density lipoprotein)*, que é absorvida por monócitos/macrófagos, levando à formação de células espumosas e ao início do processo aterosclerótico (Moore *et al.*, 2013).

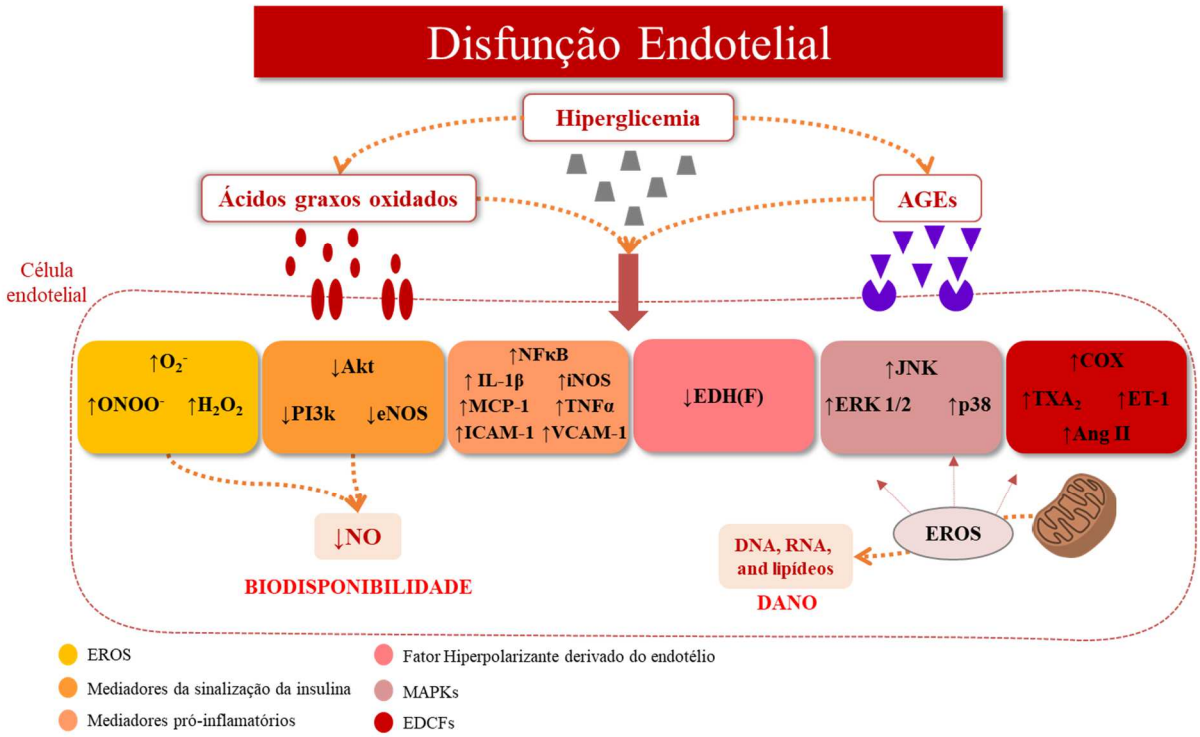
O aumento da peroxidação lipídica, ou seja, a degradação oxidativa dos lipídeos, e o consumo de NO, associado à presença de estresse oxidativo, contribuem para o dano endotelial e, ainda, para maior geração de EROs mitocondrial (Nishikawa *et al.*, 2000). O aumento da geração de EROs mitocondrial, por sua vez, leva ao dano de proteínas, DNA, RNA e lipídeos, que podem interromper o trânsito de cálcio mitocondrial levando à transição de permeabilidade mitocondrial e apoptose (James e Murphy, 2002).

Diversas quinases são ativadas pelo aumento de EROs ou estresse oxidativo no diabetes, incluindo proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), quinases reguladas por sinais extracelulares (Erk1/2), p38 MAPK, quinases N-terminais c-Jun (JNK) e proteína quinase C (PKC, *protein kinase C*), envolvidas não apenas na disfunção endotelial, mas também em processos de inflamação, angiogênese, proliferação celular, expansão da matriz extracelular,

apoptose e remodelamento vascular (Spitaler e Graier, 2002; Geraldes e King, 2010; Kolluru *et al.*, 2012).

A redução da sinalização da insulina também pode levar à disfunção endotelial por reduzir a expressão basal da eNOS, a produção de NO, e a ativação de enzimas como a quinase de fosfoinositídeos na posição 3 (PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*) e proteína quinase B (Akt, *protein kinase B*) (Jiang *et al.*, 2000), acelerando processos envolvidos na indução de doenças cardiovasculares, como aterosclerose (Kuboki *et al.*, 2000).

Figura 1 Mediadores da disfunção endotelial no diabetes.



Fonte: adaptado de Pereira *et al.,* Bonus effects of antidiabetic drugs: possible beneficial effects on endothelial dysfunction, vascular inflammation, and atherosclerosis, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2018 (aceito para publicação em fevereiro/2018).

1.4. Diabetes tipo 1 e inflamação

Podemos observar que muitas das complicações clínicas do diabetes podem ser atribuídas a alterações na função e estrutura vascular, e mediadores do processo inflamatório contribuem potencialmente para estas alterações. A inflamação desempenha papel importante no

desenvolvimento da disfunção endotelial, na geração de estresse oxidativo e também no remodelamento vascular.

O aumento de EROs, por sua vez, acelera a translocação do fator nuclear kappa B (NF-κB) e promove a transcrição de genes pró-inflamatórios, como a proteína 1 quimiotática de monócitos (MCP-1/CCL2), VCAM-1, ICAM-1, bem como citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF-α, *tumor necrosis factor*) e a interleucina-1 beta (IL-1β, *interleukin-1β*) (Hink *et al.*, 2001). Além disso, a maior ativação das vias de sinalização de NF-κB e JNK contribui para a regulação positiva da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) que, por sua vez, está envolvida na resistência à insulina e processos inflamatórios (Zhu *et al.*, 2005; Pawate e Bhat, 2006).

O estágio inicial do DM1 é marcado por um processo inflamatório denominado insulite, caracterizado pela infiltração de linfócitos e macrófagos nas ilhotas pancreáticas. Macrófagos ativados e células T liberam citocinas inflamatórias como a IL-1β, TNF-α e interferon gama (IFN-γ, *interferon-γ*) ao redor das células β pancreáticas, contribuindo para disfunção e apoptose destas células (Kaminitz *et al.*, 2007). A progressiva perda destas células promove deficiência na secreção de insulina e hiperglicemia.

A liberação de citocinas e quimiocinas em função da ativação de células da imunidade inata desencadeia processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas. Neste sentido, foram identificados receptores específicos que medeiam esta ativação e que também participam de sua regulação. Dentre estes receptores, os mais estudados são os receptores do tipo *Toll* (TLRs, *Toll-like receptors*) e receptores do tipo NOD (NLR, *NOD-like receptors*).

Os TLRs são moléculas de reconhecimento padrão expressas na superfície celular ou em vesículas endocíticas que ativam resposta inflamatória inespecífica (Grishman *et al.*, 2012). Por outro lado, os NLRs compreendem uma família de proteínas localizadas no citosol de diversos tipos celulares.

NLRP (NACHT-LRR-PYR–*containing protein*) designa a subfamília de NLR, também conhecida por Nalp, que possui em sua porção N-terminal o domínio pirina (PYR, *pyrin domain*), um domínio central comum NACTH (*nucleotide-binding and oligomerization domain*) e uma região C-terminal de repetições ricas em leucina (LRR, *leucine-rich repeat domain*), responsável pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) ou sinais de perigo endógenos denominados

de padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs, *damage-associated molecular pattern molecules*) (Kanneganti *et al.*, 2007; Kufer e Sansonetti, 2007; Geddes *et al.*, 2009).

Após o estímulo para o agrupamento de proteínas, NLR interage com a proteína adaptadora ASC (a*poptosis-associated speck-like protein*) que possui um domínio N-terminal de recrutamento de caspase CARD (c*aspase recruitment domain*) formando o complexo inflamassoma.

Até o momento cinco inflamassomas da subfamília NLR e um da ALRs (*AIM2-like receptor*) tem sido caracterizados: o inflamassoma NLRP1/NALP1b (Boyden e Dietrich, 2006), o inflamassoma NLRP6 (Grenier *et al.*, 2002), o inflammasoma NLRP12 (Wang *et al.*, 2002), o inflamassoma NLRC4/IPAF (Zhao *et al.*, 2011), o inflamassoma NLRP3/NALP3 (Martinon *et al.*, 2006) e o inflamassoma AIM2 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009). Esses tipos de inflamassomas contém então uma proteína NLR específica ou AIM2, o domínio ASC e/ou proteínas adaptadoras e pró-caspase-1.

O inflammasoma NLRP3 é o subtipo melhor caracterizado e investigado (Schroder e Tschopp, 2010).

1.5. Inflamassoma NLRP3

Os primeiros trabalhos relatando a existência do inflamassoma foram publicados entre 2002 e 2003, caracterizando os componentes da via, seus tipos, subtipos e os mecanismos associados a sua ativação (Martinon *et al.*, 2002; Srinivasula *et al.*, 2002; Tschopp *et al.*, 2003).

Desde então centenas de trabalhos foram publicados demonstrando sua importância para o desencadeamento de respostas contra a infecção por diversos patógenos como, por exemplo, o *Mycobacterium tuberculosis* (Mayer-Barber et al., 2010), bactéria causadora da tuberculose, a *Streptococcus pneumoniae* (Kafka et al., 2008), causadora da pneumonia e meningite, a *Candida albicans* (Gross et al., 2009), causadora da candidíase, dentre muitas outras.

Entretanto, além do mecanismo de proteção, o inflamassoma NLRP3 desempenha um papel crucial na patogênese de diversas doenças inflamatórias e autoimunes como a síndrome da febre hereditária (Hoffman *et al.*, 2001), a doença de Crohn (Hugot *et al.*, 1996), a síndrome de *Muckle-Wells* (Agostini *et al.*, 2004), neuropatia cranial (Miceli-Richard *et al.*, 2001), e muitas outras, contribuindo de diferentes formas.

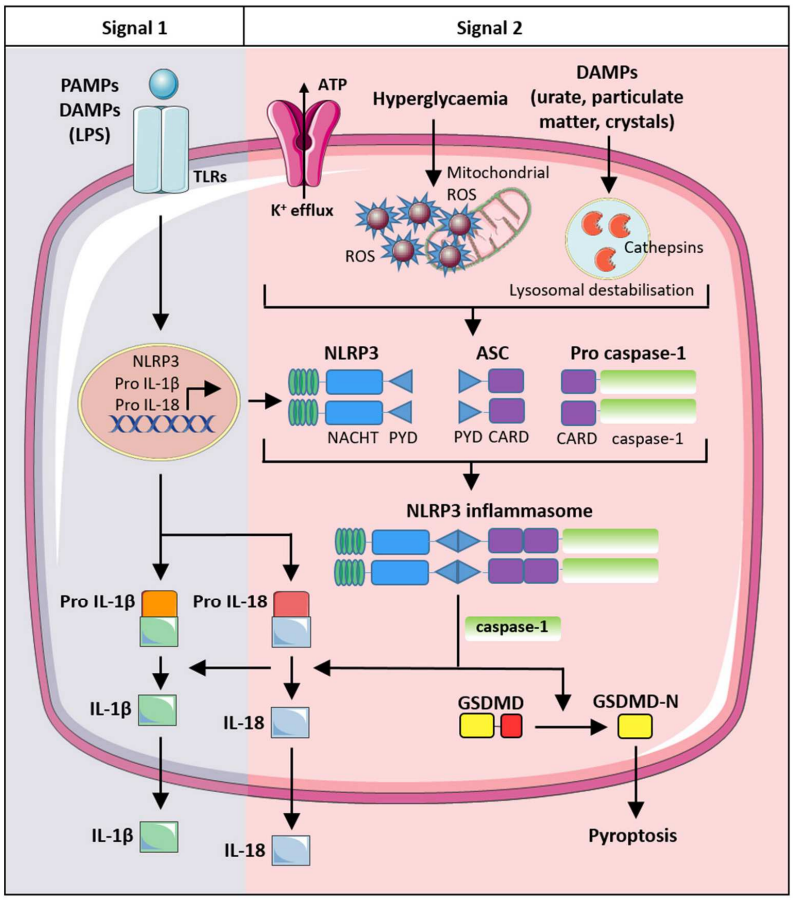
A ativação do inflammasoma NLRP3 tem sido ligada à fisiopatologia de várias desordens metabólicas e inflamatórias e doenças auto-imunes como DM2 (Masters *et al.*, 2010; Jourdan *et al.*, 2013), doenças neurodegenerativas (Heneka *et al.*, 2013), gota (Martinon *et al.*, 2006), doença de Crohn (Roberts *et al.*, 2010), câncer (Zitvogel *et al.*, 2012), doença do intestino irritável (Sun *et al.*, 2013) e aterosclerose (Duewell *et al.*, 2010).

A ativação do inflamassoma NLRP3 é atribuída a dois sinais: o primeiro sinal é representado por DAMPs ou PAMPs que ativam TLRs, culminando na ativação de quinases e fatores de transcrição como o NF-kB e levando à produção de pró-caspase-1 e também de pró-IL-1β e pró-IL-18 (Schroder e Tschopp, 2010). O segundo sinal, na ativação clássica ou canônica, é representado por diversos ativadores como, por exemplo, efluxo de potássio (K^+) (Petrilli et al., 2007), EROs mitocondrial (Schroder et al., 2010; Zhou et al., 2011; Lawlor e Vince, 2014), dano lisossomal (Chu et al., 2009), influxo de cálcio (Brough et al., 2003), entre outros, promovendo oligomerização do complexo inflamassoma, recrutamento da proteína adaptadora ASC, autoclivagem e ativação da caspase-1, a qual cliva as pró-IL-1β e pró-IL-18 em citocinas maduras (Schroder *et al.*, 2010).

Alguns estudos sugerem uma via alternativa, descrita como via não-canônica, para ativação do inflamassoma NLRP3. Nesta via há ativação de caspase-11 por lipopolissacarídeo (LPS) ou por ativação de TLR-4, por exemplo, e consequente clivagem direta de caspase-1, culminando na liberação de IL-1β e IL-18 (Kayagaki *et al.*, 2011).

Além disso, a caspase-11 em sua forma ativa pode promover abertura do receptor de panexina-1 e induzir efluxo de K^+, necessário para ativação do inflamassoma NLRP3 e liberação de IL-1β e IL-18. A ativação da caspase-11 também ativa a piroptose através da clivagem de gasdermina D (He *et al.*, 2015; Kayagaki *et al.*, 2015).

Figura 2 Representação esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3.



Fonte: Sharma et al., Oxidative Stress and NLRP3-Inflammasome Activity as Significant Drivers of Diabetic Cardiovascular Complications: Therapeutic Implications, Frontiers in Physiology, 2018.

A caspase-1 faz parte de uma família de proteases de cisteínas envolvidas na morte celular programada e na resposta inflamatória, sendo o inflamassoma um dos principais reguladores de sua ativação (Lamkanfi *et al.*, 2007).

A IL-1β, um membro da família das citocinas da interleucina 1, é importante mediador da resposta inflamatória, modulando uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose celular (Bensi *et al.*, 1987).

A liberação de IL-1β leva à ativação, através de seu receptor, o IL-1R, de várias cascatas de sinalização intracelular, promovendo a transcrição de outras citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas ou enzimas pró-inflamatórias (Palomo *et al.*, 2015). Além de seu papel na inflamação, a IL-1β também está envolvida em outros processos, como disfunção endotelial (Rizzoni *et al.*, 2001; Beckman *et al.*, 2003b).

Um recente estudo demonstrou que a incubação com doses crescentes de IL-1β compromete a vasodilatação dependente do endotélio em artérias mesentéricas de ratos, efeito este associado ao aumento do estresse oxidativo pela atividade da NADPH oxidase (Nox) (Vallejo *et al.*, 2014a).

1.6. Inflamassoma NLRP3 e o diabetes

Alguns anos após as primeiras publicações sobre o inflamassoma, Yin et al. (2009) demonstraram que este receptor também é expresso em tecidos do sistema cardiovascular como coração, sangue e vasos, fornecendo motivos para que se investigasse a sua importância sobre tal sistema (Yin et al., 2009).

Com a descoberta de mecanismos associados então ao sistema cardiovascular, o inflamassoma NLRP3 passou a ser também relacionado a diversas doenças cardiovasculares como a hipertensão (Dalekos et al., 1997; Yu et al., 2015; Qi et al., 2016), a aterosclerose (Hansson e Hermansson, 2011; Li et al., 2014; Lu e Kakkar, 2014), o infarto do miocárdio (Chen e Nunez, 2010; Mezzaroma et al., 2011), o remodelamento cardíaco (Toldo et al., 2013; Li et al., 2015) e o diabetes, o qual iremos discutir com maior detalhes neste trabalho.

Em relação ao diabetes, Pontillo et al. (2010) demonstraram que pacientes DM1 apresentam associação específica com o polimorfismo do gene NLRP3 rs10754558, sugerindo que esta alteração pode predispor o indivíduo a desenvolver desordens autoimunes (Pontillo *et al.*, 2010).

Lee et al. (2013) observaram que macrófagos de pacientes DM2 apresentam aumento na expressão gênica de componentes do inflamassoma como NLRP3, ASC, 1β e IL-18. Além disso, os macrófagos de pacientes DM2, quando estimulados com diferentes ativadores, apresentam maior clivagem de IL-1β e IL-18 em relação a macrófagos de indivíduos saudáveis, demonstrando sua ativação em células mielóides (Lee *et al.*, 2013).

Kaizer et al. (2007) também observaram aumento na expressão gênica de IL-1β em células mononucleares do sangue periférico, tanto em pacientes DM2, quanto em DM1 (Kaizer *et al.*, 2007).

Além de células do sistema imune, o inflamassoma parece estar presente em outros sistemas. Zheng et al. (2013-2014) observaram superexpressão gênica do NLRP3 e de caspase-

1 em aortas de pacientes com DM2 e aterosclerose (Zheng *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014). Luo et al. (2014) encontraram aumento na expressão gênica e proteica de NLRP3, ASC, caspase-1 e IL-1β no miocárdio de camundongos com DM2. Estes dados confirmam a presença do inflamassoma NLRP3 no sistema cardiovascular (Luo *et al.*, 2014).

Mediadores da ativação do inflamassoma NLRP3 também encontram-se aumentados no diabetes. Ururahy et al. (2012) observaram aumento na expressão de TLR-2 em leucócitos de pacientes DM1 (Ururahy *et al.*, 2012). Guzik et al. (2002) demonstraram aumento de EROs em artérias mamárias e veias safenas de pacientes diabéticos (Guzik *et al.*, 2002). Rosca et al. (2005) encontraram aumento de EROs mitocondrial em mitocôndrias renais isoladas de ratos diabéticos (Rosca *et al.*, 2005).

A relação do inflamassoma NLRP3 com o desenvolvimento e a progressão do diabetes também tem sido investigada. Hu et al. (2015) demonstraram que a ativação do inflammasoma NLRP3 é importante para a expressão de receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR3 em células T influenciando a migração patogênica destas celulas para as ilhotas pancreáticas, bem como a expressão de CCL5 e CXCL10 nas ilhotas pancreáticas, permitindo a infiltração patogênica destas células em modelo animal de DM1 (Hu *et al.*, 2015).

Carlos et al. (2017) observaram que camundongos nocautes para NLRP3, caspase-1 e ASC apresentam menor incidência de diabetes, menos insulite, menor hiperglicemia, níveis normalizados de insulina e, ainda, menor ativação da resposta inflamatória nos linfonodos pancreáticos, constatada pela menor produção de células T CD4 e CD8, quando comparados a camundongos controle (*wild-type*) (Carlos *et al.*, 2017).

Dentre todos estes fatores e mecanimos envolvendo ativação do inflamassoma NLRP3 e diabetes, um tem sido alvo do nosso interesse, o DNA mitocondrial.

Nakahira et al. (2011) demonstraram que o DNA mitocondrial liberado no citosol de macrófagos murinos derivados da medula óssea aumenta a secreção de IL-1β e IL-18 em resposta ao estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) e adenosina trifosfato (ATP) (Nakahira *et al.*, 2011). Shimada et al. (2012) observaram que a estimulação com ATP, levando a disfunção mitocondrial e apoptose também em macrófagos murinos, induz liberação de DNA mitocondrial oxidado, e que sua ligação com NLRP3 aumenta a produção de IL-1β (Shimada *et al.*, 2012).

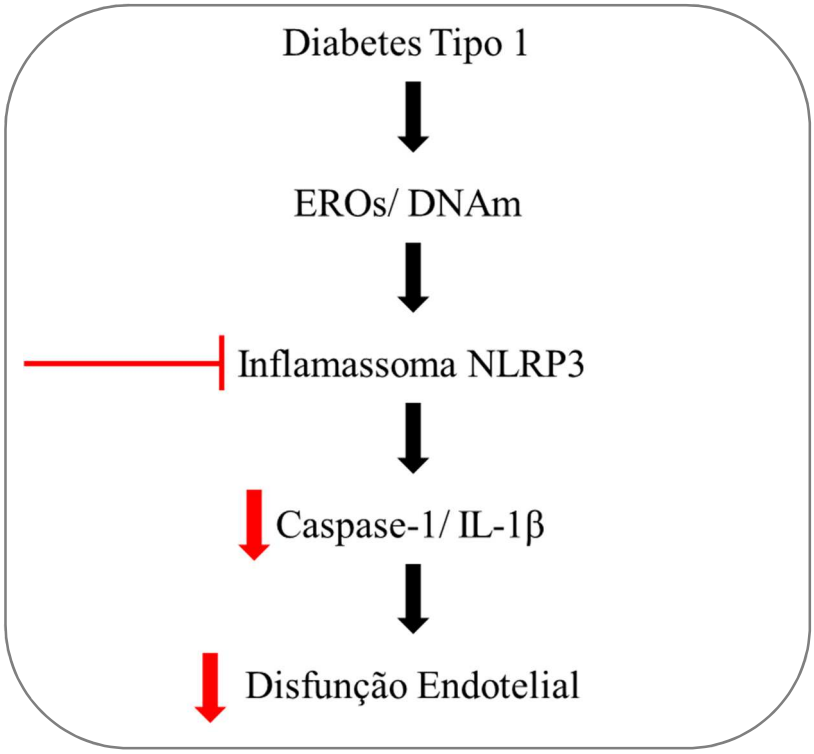
Alguns estudos mais recentes tem demonstrado que pacientes diabéticos exibem aumento nos níveis circulantes de DNA mitocondrial (Liu, J. *et al.*, 2015; Malik *et al.*, 2015). Contudo, a relação entre DNA mitocondrial circulante, inflamassoma NLRP3 e disfunção endotelial ainda não foi estabelecida.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A resposta inflamatória configura-se como fator determinante no desenvolvimento do DM1. Embora a inflamação seja peça chave no desenvolvimento do DM, até o presente momento raros estudos, experimentais ou em humanos, avaliaram o envolvimento de receptores NLRP3 na regulação da resposta imune e sua implicação na disfunção endotelial no DM1. Considerando a alta incidência do DM, sobretudo das suas complicações, torna-se importante a busca do entendimento dos mecanismos imunológicos e fisiopatológicos relacionados a esta doença. Devido a relevância destes fatos, este estudo testará a hipótese de que a deficiência genética do receptor NLRP3 confere resistência à ativação de processo inflamatório na vasculatura de animais com DM1, induzido quimicamente por estreptozotocina (STZ) e, ainda, que o DNA mitocondrial contribui para a ativação vascular do inflamassoma NLRP3 e para disfunção endotelial.

Figura 3 Representação esquemática da hipótese do trabalho



3.OBJETIVOS

3. OBJETIVO GERAL

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel funcional dos receptores NLRP3 e do DNA mitocondrial, e vias de sinalização relacionadas, no desenvolvimento da disfunção endotelial associada ao DM1.

3.1. Objetivos Específicos

a) Confirmar que camundongos diabéticos apresentam disfunção endotelial e aumento da ativação do inflamassoma na vasculatura.
b) Determinar se existe aumento do DNA mitocondrial local e circulante
c) Determinar se DNA mitocondrial promove ativação vascular do inflamassoma NLRP3.
d) Avaliar se o DNA mitocondrial induz disfunção endotelial.
e) Investigar possíveis mecanismos de ativação do inflamassoma via DNA mitocondrial.
f) Determinar se animais nocautes para NLRP3 são protegidos da disfunção endotelial induzida pelo diabetes e se há redução de marcadores de resposta inflamatória na vasculatura.
g) Investigar quais são os mecanismos envolvidos na proteção sobre a disfunção endotelial em animais nocautes para NLRP3.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pacientes

As amostras de soro de 18 pacientes com diabetes tipo 1 com idade média de ± 33,3 anos e 20 indivíduos controles com idade média de ± 28,9 anos foram cedidas pela Profa. Dra. Dora Fix Ventura e pela Dra. Valéria Duarte Garcia. As amostras foram coletadas por profissional especializado proveniente do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP (SLC-HU-USP). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de ética em pesquisa do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, (Protocolo número 644.869).

4.2. Animais

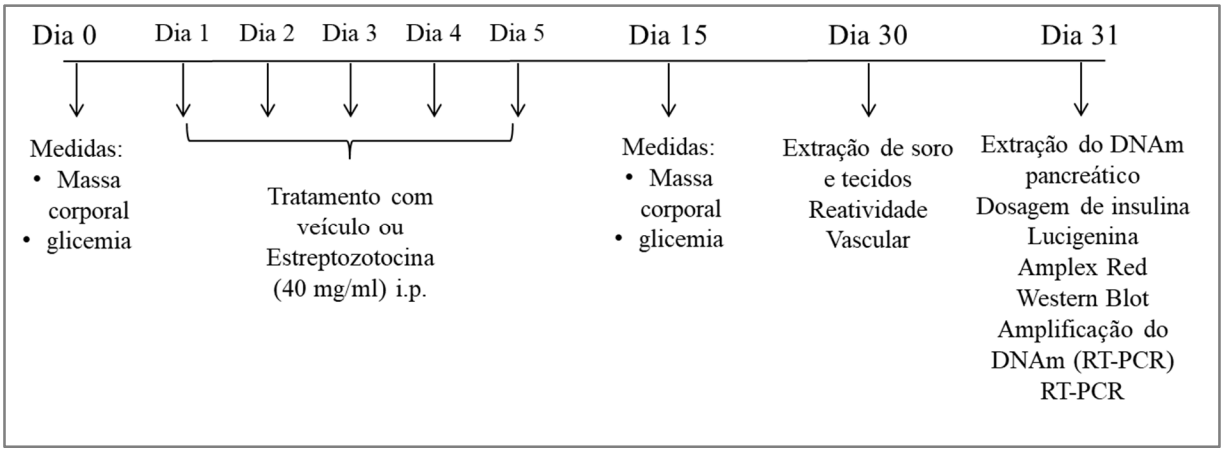
Foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos, selvagens (*wild-type* – WT) e deficientes para o receptor NLRP3 ($NLRP3^{-/-}$), entre 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 20 a 25 gramas. Os animais foram subdivididos da seguinte forma: grupo I, animais controles WT (*wild type*, controle); grupo II, camundongos WT tratados com estreptozotocina para indução do diabetes (DM1), grupo III, camundongos $NLRP3^{-/-}$ e grupo IV, camundongos $NLRP3^{-/-}$ tratados com estreptozotocina para indução do diabetes ($NLRP3^{-/-}$ DM1). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo nº 026/2015).

4.3. Indução de DM1 por STZ

Os animais receberam cinco injeções diárias, por via intraperitoneal (i.p.), de STZ na concentração final de 40 mg/Kg de massa corporal do animal em solução de citrato de sódio 25 mM, pH= 4,0. A glicemia foi avaliada semanalmente, a partir da primeira dose de STZ. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da base da cauda de cada animal.

O delineamento experimental com os animais WT (controles e DM1) e $NLRP3^{-/-}$ ($NLRP3^{-/-}$ e $NLRP3^{-/-}$DM1) está ilustrado no diagrama a seguir:

Figura 4 Período de tratamento para indução do DM1 e dos protocolos experimentais com soro e tecidos de camundongos WT e deficientes de NLRP3.



4.4. Dosagem de insulina

A quantificação de insulina no soro foi realizada pelo método imunoenzimático ELISA utilizando o kit *Insulin Mouse ELISA Kit* (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, EUA). Resumidamente, 100 µl de amostras de soro (diluição 2x) foram pipetados em placa de 96 poços (fornecida pelo kit) e então incubados por 2 horas e 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem fornecida pelo kit e, em seguida, foram adicionados 100 µl de anticorpo biotinilado por 1 hora. Após este período, foram realizadas mais quatro lavagens e 100 µl do conjugado estreptavidina-peroxidase (diluído 400x) foram adicionados por poço, permanecendo por 45 minutos em temperatura ambiente. Mais quatro lavagens foram realizadas e, então, foram adicionados 100 µl do substrato tetrametilbenzidina (TMB) por 30 minutos. Por fim, foram adicionados 50 µl de "*STOP solution*" e realizada a leitura nos comprimentos de 450-550 ηm utilizando o equipamento FlexStation® e o software SoftMax® Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

4.5. Detecção dos níveis de 8-OHdG

A quantificação dos níveis de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) no DNA do soro e do pâncreas foi realizada pelo método imunoenzimático ELISA utilizando o kit *HT 8-oxo-dG ELISA Kit II* (Trevigen®, Gaithersburg, Maryland, EUA). Resumidamente, 25 µl de amostras de soro (diluição 1:10), de DNA extraído do pâncreas (500 µg/ml), da curva padrão (3,13 a 200 nM) e da solução monoclonal de 8-OHdG foram pipetados em placa de 96 poços (fornecida

pelo kit) e então incubados por 1 hora a 25 ºC. Após a incubação, a placa foi lavada quatro vezes com salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 (PBST) e, em seguida, foram adicionados 50 µl de anticorpo *goat anti-mouse IgG-HRP* por 1 hora a 25 ºC. Após este período, foram realizadas mais quatro lavagens com PBST e 50 µl do reagente TACS-Sapphire™ foram adicionados por poço, permanecendo por 15 minutos a 25 ºC. Por fim, foram adicionados 50 µl de ácido clorídrico (0.2 M) e realizada a leitura no comprimento de 450 ηm, utilizando o equipamento FlexStation® e o software SoftMax® Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

4.6. Avaliação da função vascular

4.6.1. Preparação de Artéria Mesentérica Isolada

Para estudar a reatividade de artérias mesentéricas de resistência foi utilizado o método descrito por Mulvany & Halpern (1977). Os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO_2). O leito mesentérico foi removido, segmentos de artérias mesentéricas de segundo ramo, medindo aproximadamente 2 mm de comprimento, foram isolados e montados em miógrafo para pequenos vasos modelo 620M (Danish Myo Tech A/S®, Aarhus, Dinamarca). Dois fios de tungstênio (25 µm de diâmetro) foram introduzidos no lúmem dos segmentos de artérias mesentéricas. Um dos fios foi acoplado a um transdutor de tensão e o outro, a um micrômetro que permite o estiramento da artéria. O miógrafo foi conectado a um sistema de aquisição de dados modelo Powerlab 8-30/P (Danish Myo Tech A/S®, Aarhus, Dinamarca) e este, a um computador.

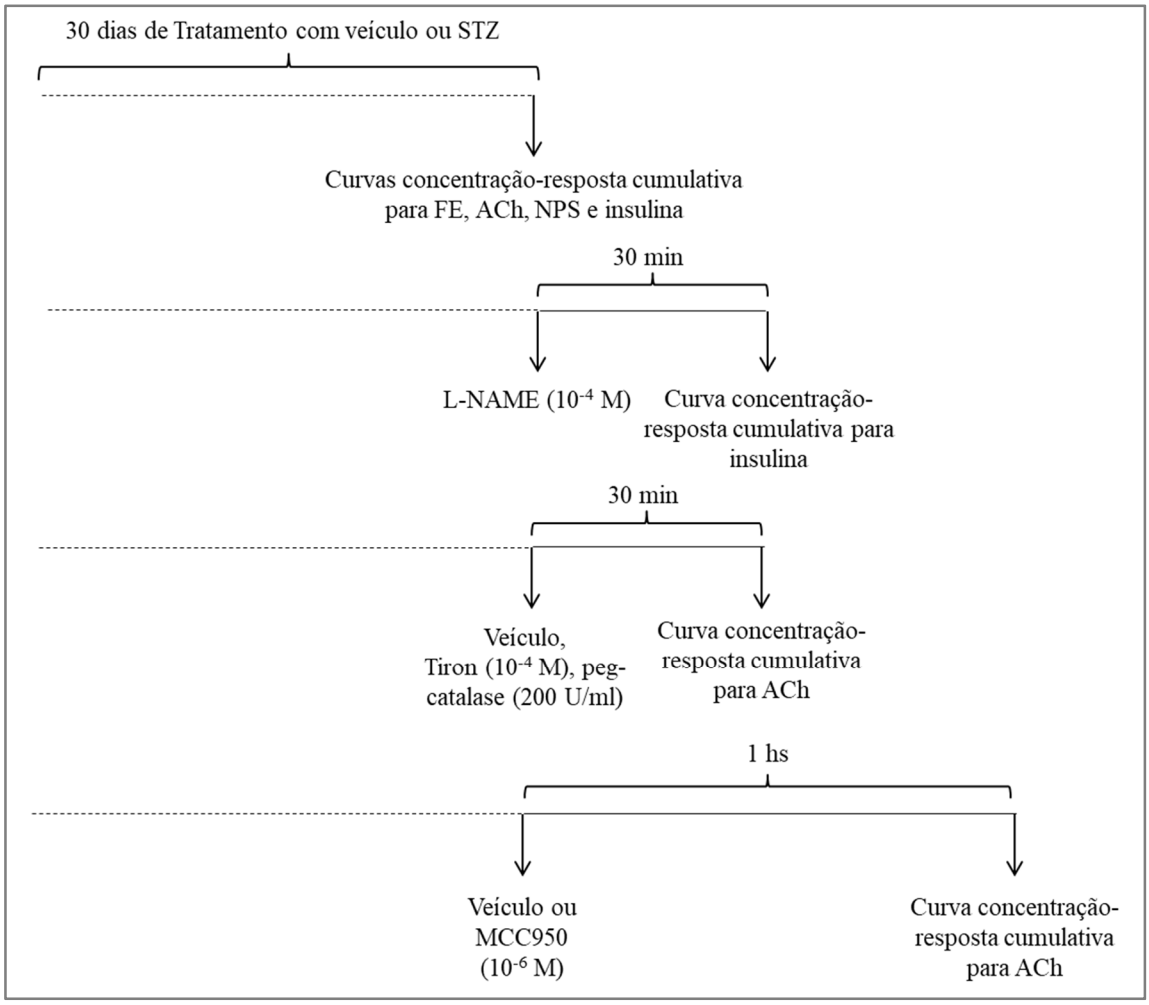
Uma vez montadas, as artérias foram mantidas em solução Krebs Henseleit [(em mM): NaCl 130; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,18; $MgSO_4$ 1,17; $NaHCO_3$ 14,9; Glicose 5,5; EDTA 0,03; $CaCl_2$ 1,6], a uma temperatura constante de 37 ºC e gaseificada com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), pH 7,4. As preparações de artéria mesentérica foram normalizadas até atingirem uma tensão de 13,3 kPa e permaneceram em repouso durante 30 minutos para estabilização. Em seguida, as artérias foram estimuladas com solução de Krebs contendo alta concentração de cloreto de potássio (KCl, 120 mM) para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos. Após o retorno das artérias à sua tensão basal, determinou-se a presença de endotélio funcional através da capacidade da acetilcolina (10^{-5} M) produzir relaxamento em artérias previamente contraídas com fenilefrina (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M).

Para a remoção do endotélio foi utilizado um fio de cabelo humano e realizada fricção mecânica na parede endotelial. Foram considerados segmentos com endotélio funcional aqueles que apresentaram relaxamento maior que 80% em resposta a 10^{-5} M de acetilcolina. Após lavagem e novo período de estabilização, foram iniciadas as curvas concentração-resposta.

4.6.2. Protocolos experimentais

Para os experimentos de função vascular, as curvas concentração-resposta foram realizadas em presença de veículo ou inibidores específicos, de acordo com o delineamento experimental ilustrado no diagrama a seguir:

Figura 5 Delineamento experimental dos protocolos de reatividade vascular.



4.6.2.1. Avaliação da Resposta vasoconstritora à Fenilefrina (Fe)

Com o objetivo de avaliar a reatividade a estímulo vasoconstritor, curvas concentração-resposta cumulativas para Fe (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio.

4.6.2.2. Avaliação da Resposta vasodilatadora à Acetilcolina (ACh)

Com o objetivo de avaliar o relaxamento vascular endotélio-dependente, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M).

4.6.2.3. Avaliação da Resposta vasodilatadora ao Nitroprussiato de Sódio (NPS)

Com o objetivo de avaliar o relaxamento vascular independente do endotélio, curvas concentração-resposta cumulativas para NPS (10^{-11} a 10^{-6} M) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas sem endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M).

4.6.2.4. Avaliação da Resposta vasodilatadora a insulina

Com o objetivo de avaliar o relaxamento induzido pela insulina, curvas concentração-resposta cumulativas para insulina (0,1 a 3.000 U/ml) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M).

4.6.2.5. Contribuição do NO para a resposta vasodilatadora a insulina

Com o objetivo de avaliar a participação do NO no relaxamento induzido pela insulina, curvas concentração-resposta cumulativas para insulina (0,1 a 3.000 U/ml) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M) após a incubação com veículo ou inibidor da oxido nítrico sintase, L-NAME (10^{-4} M) por 30 minutos.

4.6.2.6. Contribuição do NLRP3 para a redução da resposta vasodilatadora à ACh

Com o objetivo de avaliar a contribuição do NLRP3 para a redução do relaxamento induzido pela ACh, curvas concentração-resposta cumulativa para ACh (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6}

a $3x10^{-6}$ M) após a incubação com veículo ou inibidor seletivo do NLRP3, o MCC950 (10^{-6} M) por 1 hora.

4.6.2.7. Contribuição do ânion superóxido (O_2^-) para a redução da resposta vasodilatadora à ACh

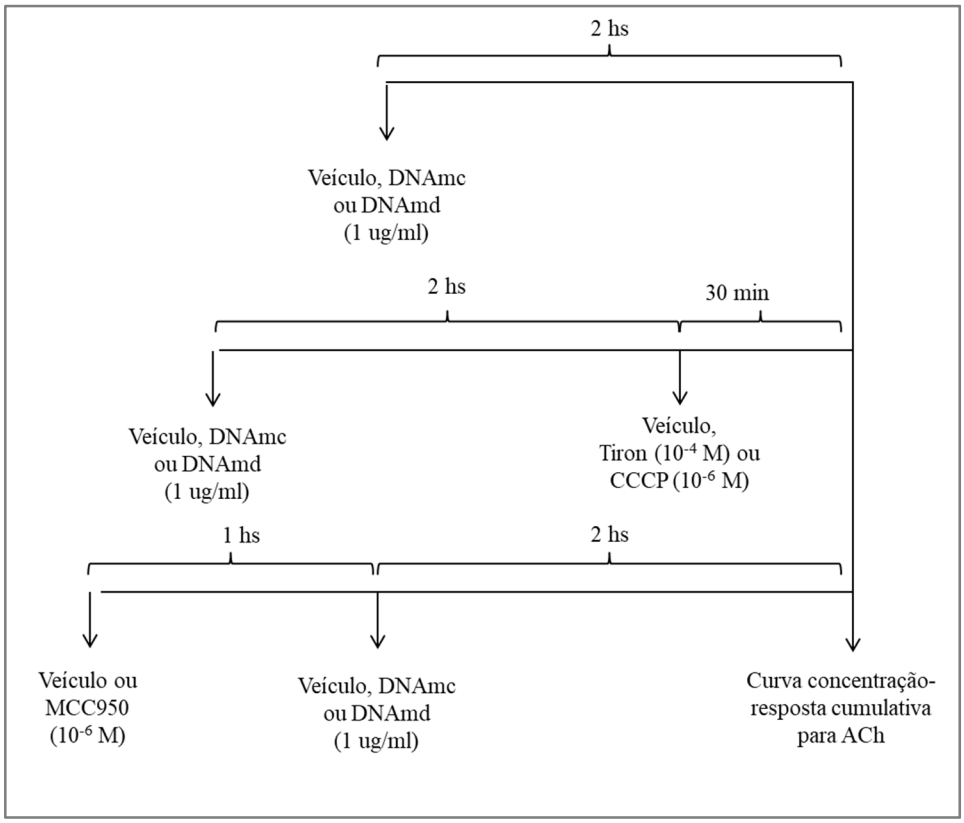
Com o objetivo de avaliar a contribuição do O_2^- para a redução do relaxamento induzido pela ACh, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M) após a incubação com veículo ou Tiron (10^{-4} M), varredor de superóxido, por 30 minutos.

4.6.2.8. Contribuição do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) para a redução da resposta vasodilatadora à ACh

Com o objetivo de avaliar a contribuição do H_2O_2 para a redução do relaxamento induzido pela ACh, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M) após a incubação com veículo ou Peg-catalase (200 U/ml), mimético da catalase, por 30 minutos.

Nos experimentos onde houve incubação com DNAm, as curvas concentração-resposta para ACh foram realizadas em presença de veículo ou inibidores específicos, de acordo com o delineamento experimental ilustrado no diagrama a seguir:

Figura 6 Delineamento experimental dos protocolos de reatividade vascular com DNA mitocondrial.



4.6.2.9. Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora à ACh

Com o objetivo de avaliar o efeito do DNA mitocondrial sobre o relaxamento induzido pela ACh, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) foram obtidas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M) após a incubação com veículo ou DNA mitocondrial pancreático de animais controle (DNAmc) e de animais DM1 (DNAmd) na concentração de 1 µg/ml, adicionado 2 horas antes da realização das curvas concentração-resposta.

4.6.2.10. Contribuição do O_2^- para a redução da resposta vasodilatadora à ACh induzida pelo DNA mitocondrial

Com o objetivo de avaliar a contribuição do O_2^- para a redução da vasodilatação a ACh induzida pelo DNA mitocondrial, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) foram obtidas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com

Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M) após a incubação com veículo ou Tiron (10^{-4} M) por 30 minutos, seguida da incubação com veículo ou DNAmd por 2 horas.

4.6.2.11. Contribuição de EROs mitocondriais para a redução da resposta vasodilatadora à ACh induzida pelo DNA mitocondrial

Com o objetivo de avaliar a contribuição das EROs mitocondriais para a redução da vasodilatação a ACh induzida pelo DNA mitocondrial, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M) após a incubação com veículo ou CCCP (10^{-6} M), desacoplador da cadeia respiratória mitocondrial por 30 minutos, seguida da incubação com veículo ou DNAmd por 2 horas.

4.6.2.12. Contribuição do NLRP3 para a redução da resposta vasodilatadora à ACh induzida pelo DNA mitocondrial

Com o objetivo de avaliar a contribuição do NLRP3 para a redução da vasodilatação a ACh induzida pelo DNA mitocondrial, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} a $3x10^{-5}$ M) foram realizadas em anéis de artérias mesentéricas com endotélio, pré-contraídas com Fe (10^{-6} a $3x10^{-6}$ M) após a incubação com veículo ou MCC950 (10^{-6} M) por 1 horas, seguida da incubação com veículo ou DNAm por 2 horas.

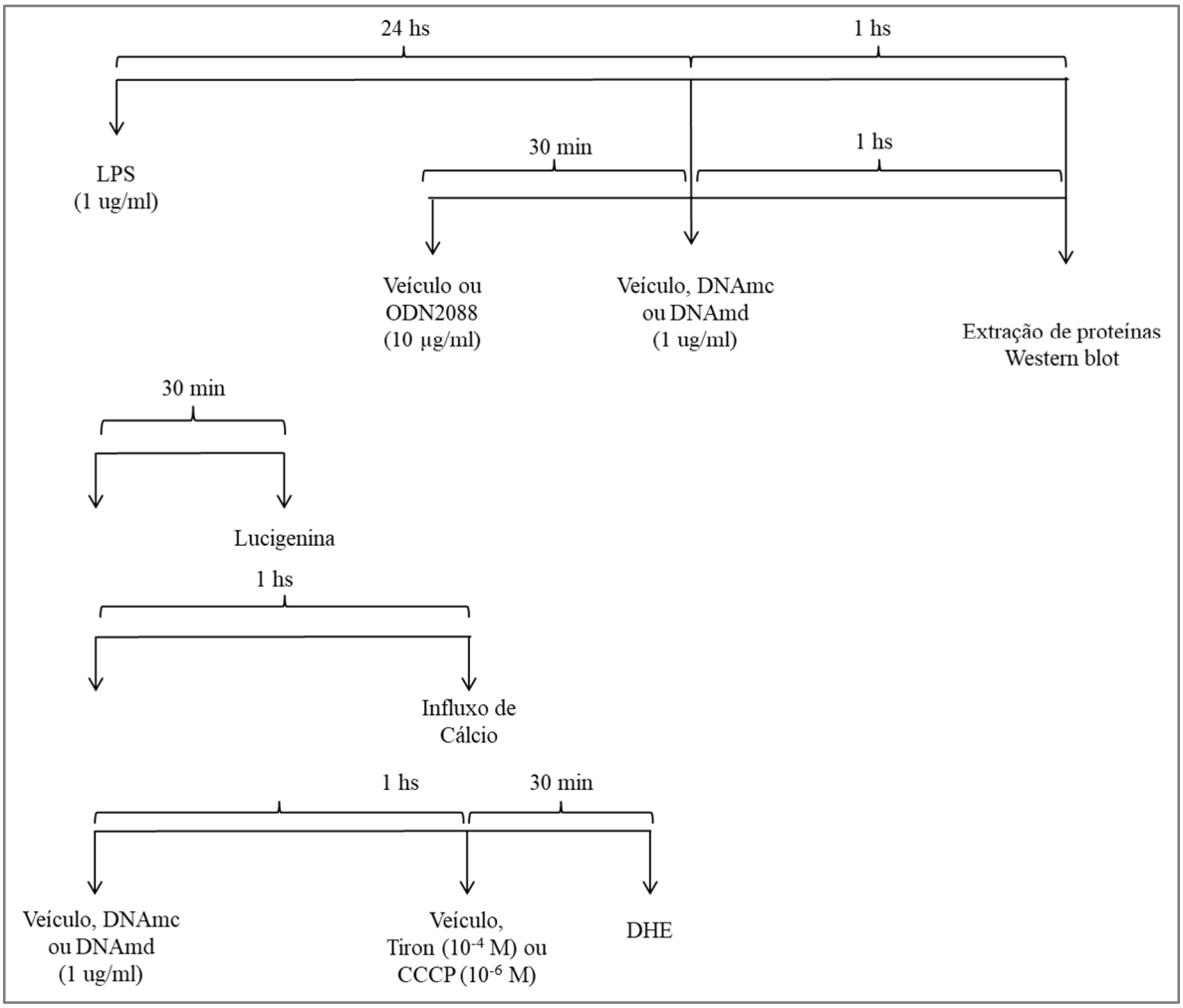
4.7. Cultura de células de músculo liso vascular (CMLV)

Camundongos C57Bl/6 machos foram submetidos à eutanásia em câmara de CO_2. CMLVs foram isoladas a partir de artérias do leito mesentérico. As artérias foram limpas de tecido adiposo e conjuntivo e as CMLV foram dissociadas por digestão com solução enzimática, consistindo de [(mg/ml), colagenase 2, elastase 0,12, inibidor de tripsina 0,36 e albumina de soro bovino tipo I 2] em meio de cultura F-12 de Ham. As células foram incubadas durante 45 minutos a 37 °C e depois filtradas através de malha de nylon com poro de 100 µM. A suspensão de células foi centrifugada a 2.000 g e ressuspensa em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e antibióticos (penicilina e gentamicina), pH 7,4. As células foram colocadas em placas de cultivo celular (100x20 mm), incubadas em estufa de CO_2 (5%), a 37ºC até atingirem 80% de confluência. As células foram repicadas em novas passagens até serem

utilizadas nos protocolos experimentais (P2 a P8). As células foram privadas de SFB 24 horas antes dos experimentos.

Nos experimentos onde as CMLV foram incubadas com DNAm, para avaliar a ativação do inflamassoma NLRP3 e os mecanismos envolvidos, os protocolos foram realizados em presença de veículo ou inibidores seletivos, conforme delineamento experimental ilustrado no diagrama a seguir:

Figura 7 Delineamento experimental dos protocolos de estimulação de CMLV com DNAm.



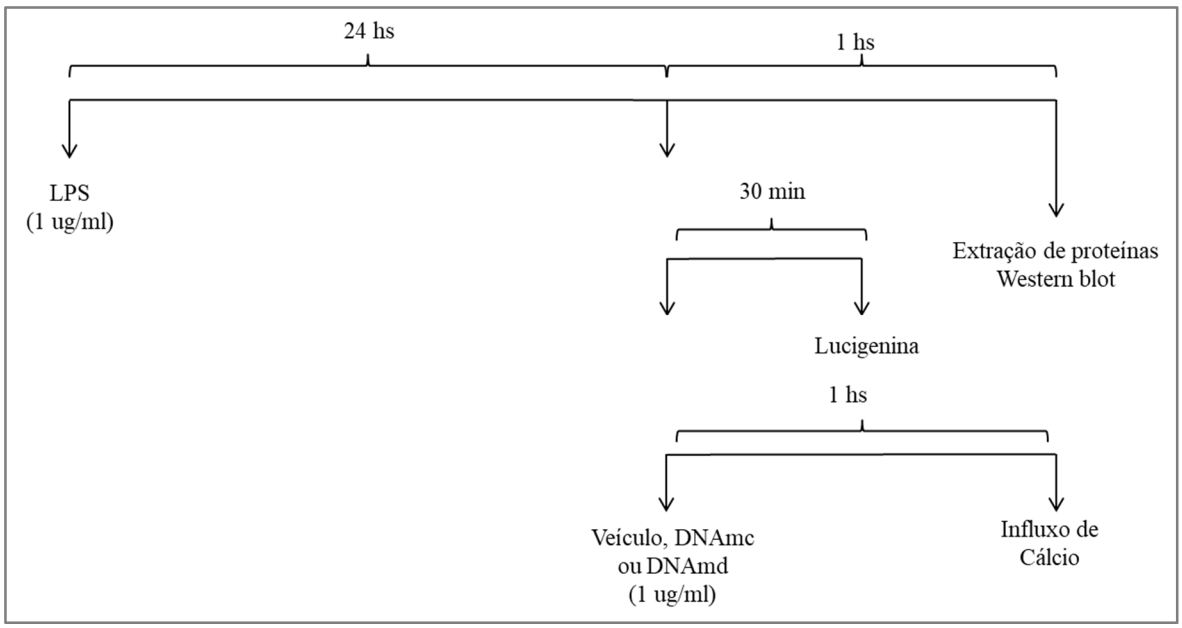
4.8. Cultura da células endoteliais EAhy926 (ATCC® CRL-2922 ™)

As células endoteliais foram cultivadas em DMEM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), suplementado com SFB a 10% e antibióticos (penicilina e gentamicina), pH 7,4. As células foram repicadas em novas passagens até serem utilizadas nos protocolos

experimentais. As células foram privadas de SFB 1 hora antes dos experimentos. Os estímulos foram realizados em placas de 6 poços.

Nos experimentos onde as células endoteliais foram incubadas com DNAm, para avaliar a ativação do inflamassoma NLRP3 e os mecanismos envolvidos, os protocolos foram realizados em presença de veículo ou inibidores seletivos, conforme delineamento experimental ilustrado no diagrama a seguir:

Figura 8 Delineamento experimental dos protocolos de estimulação de células endoteliais com DNAm.



Para a realização dos protocolos, tanto em CMLV quanto em células endoteliais, os estímulos foram previamente padronizados através da incubação com DNAm em diferentes tempos e concentrações, sendo utilizados o tempo e a concentração onde foram observadas as respostas mais relevantes para cada protocolo experimental.

4.9. Quantificação de DNA mitocondrial

O DNA foi extraído e purificado segundo instruções do kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen®, Hilden, Alemanha). O DNA isolado do soro e do pâncreas dos camundongos foi amplificado e quantificado usando RT-PCR (*reverse transcription polimerase chain reaction*). Os resultados foram apresentados pela razão 1/CT.

Tabela 1 *Primers* utilizados

Alvo	Espécie	Jusante *(Forward)*	Montante *(Reverse)*
Citocromo B (Cit B)	murino	5'-ACCTCAAAGCAACGAAGCCT- 3'	5'- GGTTGGCCTCCAATTCAGGT-3'
	humano	5'-ATGACCCACCAATCACATGC- 3'	5'-ATGCCCCAATACGCAAAAT- 3'
Citocromo C (Cit C)	murino	5'-GACTTGCAACCCTACACGGAT-3'	5'- CCGGTTAGACCACCAACTGT-3'
	humano	5'– ATGACCCACCAATCACATGC- 3'	5'– ATCACATGGCTAGGCCGGAG- 3'
subunidade da NADH desidrogenase 6 (NADH)	murino	5'-ATTCCACCCCCTCACGACTA- 3'	5'- TGTCGTTTTGGGTGAGAGCA- 3'
	humano	5' – ATACCCATGGCCAACCTCCT-3'	5' – GGGCCTTTGCGTAGTTGTAT- 3'

4.10. Isolamento de DNA mitocondrial no pâncreas

Pâncreas de camundongos controles e diabéticos foram submetidos a protocolos para isolamento das mitocôndrias. Um pool de 5 a 7 pâncreas foi congelado, pulverizado e homogeneizado em 5 ml de tampão de extração [(em mM): HEPES 10, sacarose 250 e EGTA 1, pH 7,2), centrifugado a 600 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 2.000 g durante 10 minutos. O pellet contendo as mitocôndrias isoladas foi centrifugado duas vezes (2x) com tampão de extração. O pellet final foi ressuspendido em 500 µl de tampão de lise [(em mM): TRIS (tris hidroximetil aminometano) 10, EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) 20, SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,5%, pH 8,0) e 500 µl de uma mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) e centrifugado a 10.000 g durante 5 minutos a 18°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo Eppendorf (2 ml) com volume igual da mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico seguido de centrifugação a 10.000 g a 18°C durante 5 minutos. A nova fase aquosa foi transferida para outro tubo Eppendorf (2 ml) com o volume igual de isopropanol e 20 µl de NaCl (5 mM). O Eppendorf foi incubado por 15 minutos a -80ºC e centrifugado a 10.000 g a 18°C durante 5 minutos. O isopropanol foi aspirado e 500 µl de etanol foram adicionados; O Eppendorf foi centrifugado a 10.000 g a 18°C durante 5 minutos. O etanol foi aspirado e o pellet foi ressuspendido em 200 µl de água dicarbonato de dietila (DEPC). A quantificação foi realizada por espectrofotometria (260 ηm) no aparelho Epoch™ Microplate (BioTek Instruments®, Winooski, Vermont, EUA).

4.11. Western Blot

O leito mesentérico, livre de tecido adiposo, congelado em nitrogênio líquido e pulverizado, ou o extrato celular – no caso das CMLV em cultura, foi homogeneizado em tampão de lise gelado [(em mM): TRIS 100 (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100, fluoreto de sódio 100, EDTA 10, ortovanadato de sódio 10, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 2], Triton-X-100 1% e aprotinina 0,01 mg/ml. O extrato foi colocado em tubos Eppendorf em um homogeneizador de tubos a 4ºC por 2 horas. Os extratos teciduais foram centrifugados a 13.000 rpm a 4ºC por 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o conteúdo proteico total foi quantificado, utilizando o método de Bradford (BioRad®, Hercules, Califórnia, EUA) (Bradford, 1976).

Após a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford, as proteínas (35-60 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Para comprovar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau 2%. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados pela incubação da membrana com solução de albumina de soro bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) a 5% ou de acordo com as especificações do fabricante. A visualização das bandas foi obtida após reação com reagente Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore®, Burlington, Massachusetts, EUA) e a captura da imagem realizada em fotodocumentador ImageQuant 350 (GE Healthcare®, Piscata Way, NJ, EUA). As imagens foram quantificadas pelo programa Image J®.

Tabela 2 Anticorpos utilizados

Anticorpo	Diluição	Marca/número no catálogo
Anti-NALP3	1-500	Abcam ab4207
Caspase-1	1-500	Novus Biologicals 14F468
Interleucina 1 beta (IL-1β)	1-500	Santa Cruz Biotechnology sc-7884
NADPH oxidase 1 (Nox1)	1-1000	Abcam ab55831
NADPH oxidase 4 (Nox4)	1-2000	Abcam ab61248
Catalase	1-2000	Cell Signaling 8841s
Superóxido Dismutase (SOD-1)	1-3000	Abcam ab13498
Bax	1-1000	Cell Signaling #2772
Bcl-2	1-1000	Santa Cruz Biotechnology sc-23960
Canais de ânion dependentes de voltagem (VDAC)	1-1000	Cell Signaling #4866
Citocromo C (Cit C)	1-1000	Cell Signaling #4280
Beta-actina (*β-Actin*)	1-3000	Cell Signaling #4967
ANTI-GAPDH	1-20000	Sigma-Aldrich G9545

4.11.1. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Para determinação da concentração proteica nas amostras, seguimos o protocolo de Bradford. A cada experimento foi construída uma curva padrão com solução de albumina nas concentrações de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg/ml. Para tanto, a cada 250 µl do reagente de Bradford, foram adicionados 10 µl de cada amostra ou ponto da curva-padrão. Quando necessário, a amostra foi diluída 1:5, 1:10 e 1:100. O branco foi determinado pela leitura de 10 µl de água diluída em 250 µl do reagente de Bradford. A absorbância foi lida a 595 ηm e, para determinação proteica, subtraiu-se o valor da absorbância do branco de cada amostra e o resultado foi aplicado à equação de reta da curva padrão. O resultado foi expresso em µg proteína/µl.

4.12. RT-PCR

A expressão gênica (RNAm) foi determinada por reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, *Reverse transcription- Polymerase chain reaction*) em artérias mesentéricas dos grupos WT e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo ou STZ.

As artérias mesentéricas dos grupos foram rapidamente isoladas e congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos congelados foram homogeneizados e colocados em tubos contendo 1 ml de Trizol (isotiocianato de guanidina em solução de fenol) (Invitrogen® Carlsbad, Califórnia, EUA).

Após a incubação do tecido homogeneizado por 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µl de clorofórmio para cada 1 ml de Trizol. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 segundos e incubados por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (13.000 g, 15 minutos, 4°C) e a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo, onde foram acrescentados 600 µl de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão dos tubos e incubadas a -20°C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (13.000 g, 15 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi desprezado. Um 500 µl de etanol absoluto foi adicionado ao pellet. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 13.000 g, por 5 minutos a 4°C. O etanol foi removido e o pellet foi ressuspendido em 10 µl de água contendo 0,1% de DEPC.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria (260 ηm) em aparelho Epoch™ Microplate (BioTek Instruments®, Winooski, Vermont, EUA). O critério de pureza utilizado foi a razão entre os comprimentos de onda de 260/280 ηm (ácido nucléico/proteína) de aproximadamente 1,8. A concentração foi obtida em ng/µl e foram utilizados para leitura 2 µl de amostra.

A reação de transcrição reversa é o processo pelo qual o ácido ribonucleico (RNA) é usado como um molde para sintetizar ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). Para a eliminação do DNA contaminante proveniente da extração do RNA, foi utilizado o kit *DNase I Amplification Grade* (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) utilizando 1 µl de tampão de reação (10X), 1 µl da enzima DNAse I, 6 µl de água DEPC e 1 µl de RNA (1 µg) por 15 minutos. A reação foi encerrada com 1 µl de *STOP solution* e então as amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos.

Após este processo, a síntese do cDNA foi realizada utilizando o Kit Multiscrib RT® (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA). A reação foi preparada com 2 µl de tampão (10x), 2 µl de solução de sondas (*primers*) randômicas (10x), 0,8 µl de solução de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (25x), 1 µl de solução de enzima Multiscrib RT (50 U/µl) e 4,2 µl de água DEPC, totalizando o volume final de 20 µl.

As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 120 minutos e a 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -80°C até a realização da reação de RT-PCR. A expressão dos genes foi quantificada pelo sistema TaqMan™ (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA).

As amostras foram incubadas a 50°C por 2 minutos, em seguida a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos com temperaturas de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, no aparelho Applied Biosystems® 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA). A reação RT-PCR foi realizada em um volume final de 20 µl contendo oligonucleotídeos específicos, que foram construídos a partir de informações retiradas do GENEBANK.

Foram analisados os seguintes genes: ICAM-1 (Icam1) [Mm00516023_m1] e VCAM-1 (Vcam1) [Mm01320970_m1]. Como controle interno, utilizamos a Glicerol-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) [Mm99999915_g1], [código de ensaio Taqman - Life Technologies].

Foi fixado um valor de limiar (*threshold*) para cada gene. O *threshold* é um nível de sinal do corante sinalizador normalizado utilizado para determinação do Ct (ciclo *threshold*) em ensaios de tempo real. É o nível arbitrário de fluorescência estabelecido acima da linha basal e dentro da região de crescimento exponencial. O Ct é a quantidade de ciclos que cada amostra precisa para cruzar a linha *threshold*. Os valores de Ct são logarítmicos e são usados para as análises quantitativas.

4.13. Lucigenina

A geração de ânion superóxido no leito mesentérico e nas CMLV e endoteliais foi avaliada por ensaio de quimioluminescência, utilizando a lucigenina como aceptor de elétrons e NAD(P)H como substrato. O leito mesentérico de animais controle (Controle e NLRP3$^{-/-}$) e diabéticos (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) foi colocado em tubos de vidro contendo 950 µl de solução

HANK´S [(em mM): NaCl 120, $CaCl_2$ 1,6, KCl 5, $MgCl_2$ 6 H_2O 1, NaH_2PO_4 0,5, Glicose 10, HEPES 10) e 5 µl de lucigenina (5 µM) para leitura basal da luminescência. Após a leitura basal, 50 µl de NADPH (100 µM) foram adicionados ao tubo para leitura da geração de superóxido. Foi utilizado o luminômetro Line TL Tube Luminometer (Titertek-Berthold®, Pforzheim, Alemanha). A geração de ânion superóxido foi expressa em unidades relativas de luminescência (URL) (NADPH – basal) pelo peso seco do tecido [URL/peso seco (g)].

Os ensaios com células foram realizados em placa de 6 poços. Ao final dos estímulos, as células foram desaderidas mecanicamente com 100 µl de Tampão de lise [(em mM): KH_2PO_4 20, EGTA 1] e coquetel inibidor de protease [aprotinina 1µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, PMSF 1 mM] e transferidas para tubos Eppendorf. Em uma placa de 96 poços (branca) foram pipetados 50 µl de amostra, 173,75 µl de tampão fosfato [(em mM): KH_2PO_4 50, EGTA 1, Sacarose 150) e 1,25 µl de lucigenina. Foi realizada a leitura da luminescência basal (3 minutos) e, em seguida, foram adicionados 25 µl de NADPH (1 mM) por poço e uma nova leitura (15 minutos) foi realizada utilizando luminômetro Orion II Microplate Luminometer (Titertek-Berthold®, Pforzheim, Alemanha). A geração de ânion superóxido foi expressa em URL (NADPH – basal) por µg de proteína (URL/µg prot).

4.14. Amplex Red

O leito mesentérico de animais controle (Controle e NLRP3$^{-/-}$) e diabéticos (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi pulverizado em solução de Krebs gelada e centrifugado a 2.000 rpm por 1 minuto. A produção de peróxido de hidrogênio foi avaliada em alíquotas de 50 µl do sobrenadante, usando kit para dosagem de peróxido de hidrogênio, Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, EUA). A fluorescência emitida foi medida nos comprimentos de 530-590 ηm utilizando o equipamento FlexStation® e o software SoftMax® Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA). Curva padrão para peróxido de hidrogênio foi construída com o padrão do fabricante, em temperatura ambiente e utilizada para determinar a concentração de peróxido de hidrogênio das amostras. O resultado foi expresso como a média das concentrações absolutas detectadas nas amostras (µmol/l). A quantificação foi corrigida pela concentração de proteínas totais.

4.15. DHE

A geração de ânion superóxido foi determinada pela detecção de produtos da oxidação fluorescente pelo brometo de dihidroetídio (DHE). Após os estímulos, as CMLV foram incubadas com DHE (5 µM; Polysciences) diluído em tampão fosfato com ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA [100 µM]), em uma câmara protegida da luz e umidificada, a 37°C por 30 minutos. A fluorescência foi detectada no comprimento de onda de emissão de 490-515 ηm, em microscópio (Olympus, BX50) com uma lente objetiva de 20x acoplada a uma câmera digital. As imagens fluorescentes foram analisadas medindo a densidade óptica média da fluorescência em um sistema de computador (software Image J®) e normalizadas pela área.

4.16. Influxo de Cálcio

O ensaio do influxo de Ca^{2+} foi realizado utilizando o kit *FLIPR Calcium 5 Assay Kit* (Molecular Devices®, San José, Califórnia, EUA). As CMLV e endoteliais foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo transparente (Corning Inc.®, Corning, EUA) a densidade de 50.000 células por poço em DMEM com 10% de SFB e incubadas *overnight* a 37ºC e 5% de CO_2.

No dia seguinte, os estímulos foram realizados em DMEM sem vermelho de fenol. Em seguida, as células foram incubadas a 37ºC e 5% de CO_2 por 1 hora com 100 µl de solução Dye (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). As alterações transitórias na concentração de Ca^{2+} induzidas por adenosina trifosfato (ATP) (10^{-5} M) foram medidas pela fluorescência detectada no comprimento de onda de emissão de 515-575 ηm utilizando o equipamento FlexStation® e o software SoftMax® Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA). As respostas induzidas por ATP foram determinadas imediatamente após a sua adição e medidas como pico da intensidade fluorescente menos a intensidade fluorescente basal e a área sob a curva (AUC) foi calculada.

4.17. Drogas e sais utilizados

Cloridrato de fenilefrina, cloreto de acetilcolina, nitroprussiato de sódio, L-NAME (*Nω-Nitro-L-arginine* methyl ester hydrochloride), lipopolisacarídeo (LPS), nigericina, lucigenina (*N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate)*, peg-catalase (*Catalase−polyethylene glyc*ol),

inibidor de protease, ortovanadato de sódio, Tween, BSA, Triton, EDTA e PMSF foram obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, EUA). O MCC950 foi adquirido da Avistron® (Bude, Cornwall, Reino Unido). Tiron foi obtido da Santa Cruz Biotechnology® (San Juan, Califórnia, EUA). ODN2088 foi adquirido da Invitrogen® (Carlsbad, Califórnia, EUA). CCCP (*Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*) foi adquirido da Tocris Bioscience® (Bristol, Reino Unido). Todos os reagentes utilizados no RT-PCR foram obtidos da Invitrogen® (Carlsbad, Califórnia, EUA). Os *primers* murinos foram adquiridos da Invitrogen®, e os *primers* de humanos, da Sigma-Aldrich®. DTT foi adquirido da Millipore® (Burlington, Massachusetts, EUA). TRIS, glicerol, mercaptoetanol e SDS foram obtidos da Synth® (São Paulo, SP, Brasil). Todos os outros sais utilizados foram obtidos da Merck® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para a cultura celular, DMEM foi adquirido da Sigma®, soro fetal bovino (SFB), antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) e fungicida (Fungizona) foram adquiridos da Gibco Thermo Fisher Scientific® (Waltham, Massachusetts, EUA).

4.18. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As respostas contráteis em artéria mesentérica isolada estão representadas como a força desenvolvida (mN) a partir do tônus basal. As respostas de relaxamento estão 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 usando-se o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software®, La Jolla, Califórnia, EUA). A potência dos agonistas e a resposta máxima estão expressas como pD_2 (logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima [-log EC_{50}]) e Rmáx (efeito máximo produzido pelo agonista), respectivamente.

A expressão gênica foi analisada pelo método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Calculou-se a média do Ct e desvio padrão das duplicatas. Os valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ de cada amostra foram normalizados pela expressão de GAPDH e apresentadas relativamente ao controle.

Análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância de duas vias (ANOVA-TWO WAY) seguido do teste de múltiplas comparações Tukey para o caso de comparação de mais de duas médias ou pelo teste “t” de *Student* no caso de comparação de duas médias. O nível de significância mínima aceitável foi $P<0,05$.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Primeiramente caracterizamos os grupos experimentais avaliando a massa corporal, a glicemia e os níveis de insulina para confirmar que o tratamento com STZ foi efetivo.

5.1. Avaliação da massa corporal, glicemia e insulina

Não houve diferença nos valores de massa corporal entre os grupos experimentais ao final do tratamento com STZ (figura 9A). Os valores de glicemia foram significativamente maiores em animais tratados com STZ em comparação aos animais controle [(mg/dL), DM1 = 316,0 ± 21,5 *vs.* controle = 158,0 ± 6,5; P<0,05] (figura 9B). Os níveis de insulina, como esperado, foram menores nos animais diabéticos [(µlU/ml), DM1 = 20,4 ± 1,5 *vs.* controle = 30,3 ± 1,6; P<0,05] (figura 9C).

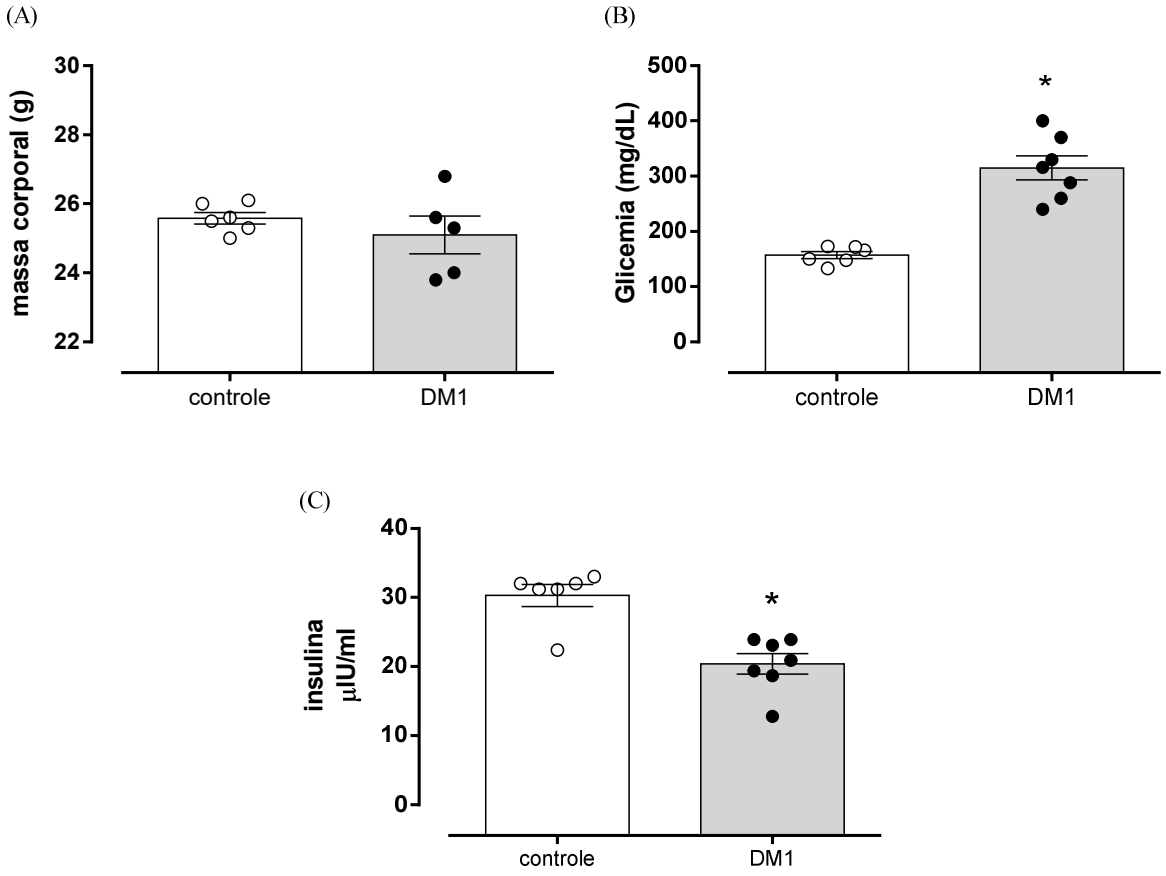


Figura 9 (A) Massa corporal (g), (B) glicemia (mg/dL) e (C) insulina (µlU/ml) de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) por 15 dias. Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=5-7.

A partir da confirmação da indução do diabetes, avaliamos a função vascular dos animais determinando as respostas de contração e relaxamento dependente e não-dependente do endotélio.

5.2. Avaliação das respostas vasoconstritora e vasodilatadora no diabetes

O diabetes não alterou a resposta vasoconstritora a FE (figura 10A), ou a resposta vasodilatadora induzida por NPS, que promove relaxamento independente do endotélio (figura 10C). Entretanto, animais diabéticos apresentaram redução da sensibilidade e da resposta máxima vasodilatadora a ACh, agonista que promove relaxamento dependente do endotélio [pD_2, DM1= 6,2 ± 0,2 *vs.* controle = 6,7 ± 0,1; Rmáx, DM1 = 47,2 ± 4,9 *vs.* controle = 90,1 ± 3,2; P<0,05] (figura 10B).

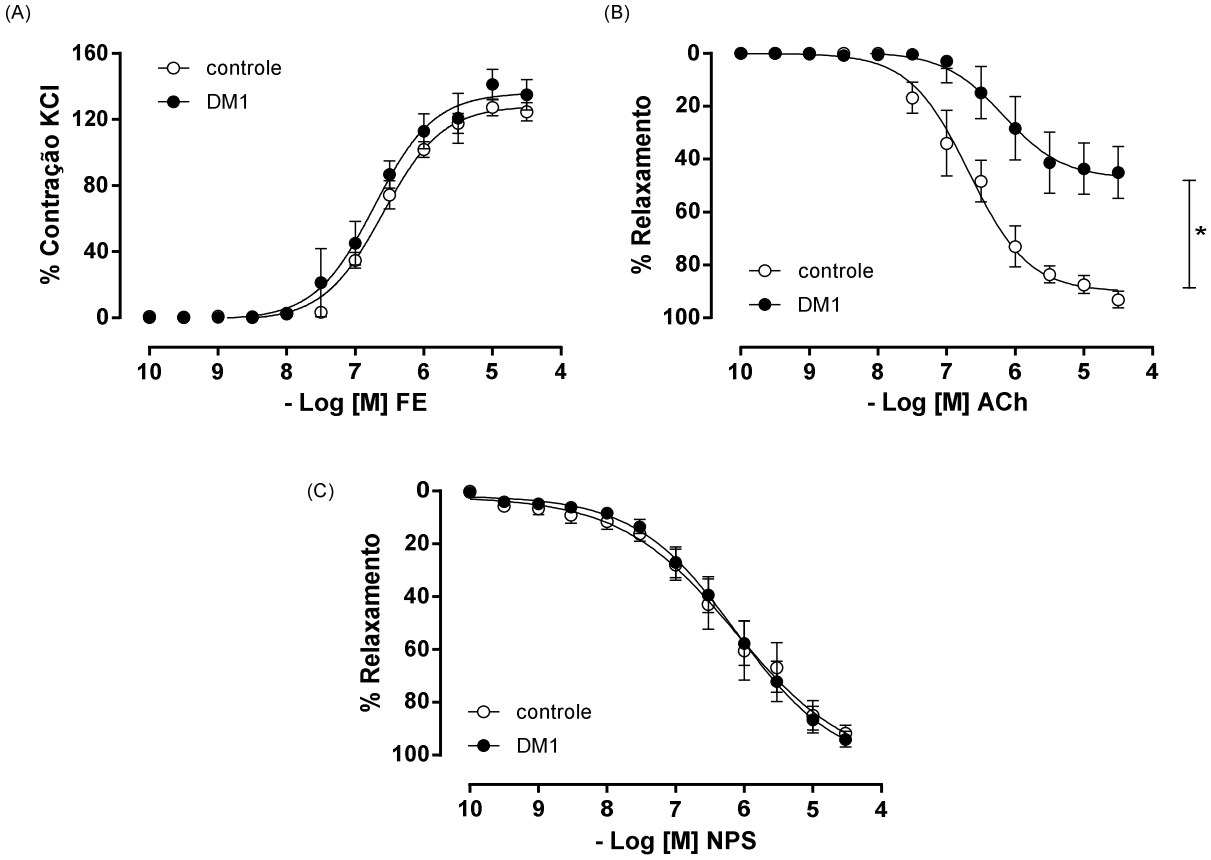


Figura 10 Curvas concentração-resposta para (A) fenilefrina (FE), (B) acetilcolina (ACh) e (C) nitroprussiato de sódio (NPS) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=8-10.

Tabela 3 Resposta Máxima e sensibilidade a FE, ACh e NPS em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1).

	Controle		**DM1**	
	Rmáx	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**
FE	128,2 ± 2,6	6,6 ± 0,1	136,2 ± 5,5	6,7 ± 0,1
ACh	90,1 ± 3,2	6,7 ± 0,1	47,2 ± 4,9*	6,2 ± 0,2*
NPS	104,7 ± 4,3	6,1 ± 0,3	104,6 ± 2,9	6,1 ± 0,2
	(8)		(10)	

Os valores de Rmáx (Resposta máxima) representam a média ± E.P.M.
pD_2– logaritmo negativo da EC_{50} (concentração que promove 50% da Rmáx)
O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.
*, P<0,05 *vs.* controle

Avaliamos também os efeitos do diabetes sobre a resposta de relaxamento induzida pela insulina, tanto sobre o componente dependente, como sobre o componente independente de NO, pela incubação com L-NAME, inibidor da óxido nítrico sintase.

5.3. Avaliação da resposta vasodilatadora a insulina no diabetes

O diabetes reduziu a vasodilatação promovida pela insulina [Rmáx, DM1 = 30,3 ± 3,3 *vs.* controle = 66,8 ± 4,2; P<0,05] (figura 11A). O relaxamento induzido pela insulina de maneira independente do NO, em presença de L-NAME 10^{-4} M, foi semelhante entre os grupos (figura 11B).

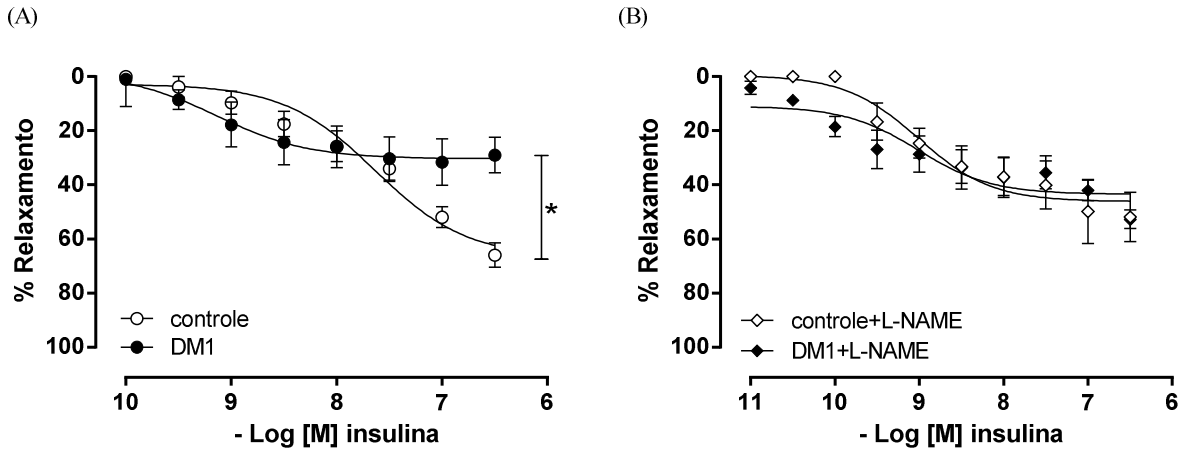


Figura 11 Curvas concentração-resposta para insulina em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1), (A) antes e (B) após incubação com L-NAME (10^{-4} M). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=5-6.

Tabela 4 Resposta Máxima e sensibilidade a insulina em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1), antes e após incubação com L-NAME.

	Controle		**DM1**		**Controle+ L-NAME**		**DM1+ L-NAME**	
	Rmáx	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**
insulina	66,8 ± 4,2	7,6 ± 0,1	30,3 ± 3,3*	9,1 ± 0,3*	45,7 ± 4,2	9,1 ± 0,2	40,8 ± 5,0	9,5 ± 0,3
	(5)		(6)		(5)		(5)	

Os valores de Rmáx (Resposta máxima) representam a média ± E.P.M.
pD_2– logaritmo negativo da EC_{50} (concentração que promove 50% da Rmáx)
O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.
*, P<0,05 *vs.* controle

Após avaliação dos danos funcionais causados pelo diabetes na vasculatura, avaliamos se o diabetes promove ativação vascular do inflamassoma NLRP3.

5.4. Avaliação da ativação vascular do inflamassoma NLRP3 no diabetes

A expressão vascular de NLRP3 [Unidades arbitrárias (U.A.), DM1 = 3,7 ± 0,3 *vs.* controle = 0,9 ± 0,1; P<0,05] (figura 12A), assim como a ativação de caspase-1 [U.A., DM1 = 3,6 ± 0,5 *vs.* controle = 1,0 ± 0,3; P<0,05] (figura 12B) e de IL-1β [U.A., DM1 = 5,5 ± 2,2 *vs.* controle = 1,4 ± 0,2; P< 0,05] (figura 12C) foi maior em camundongos diabéticos relativamente ao observado no grupo controle.

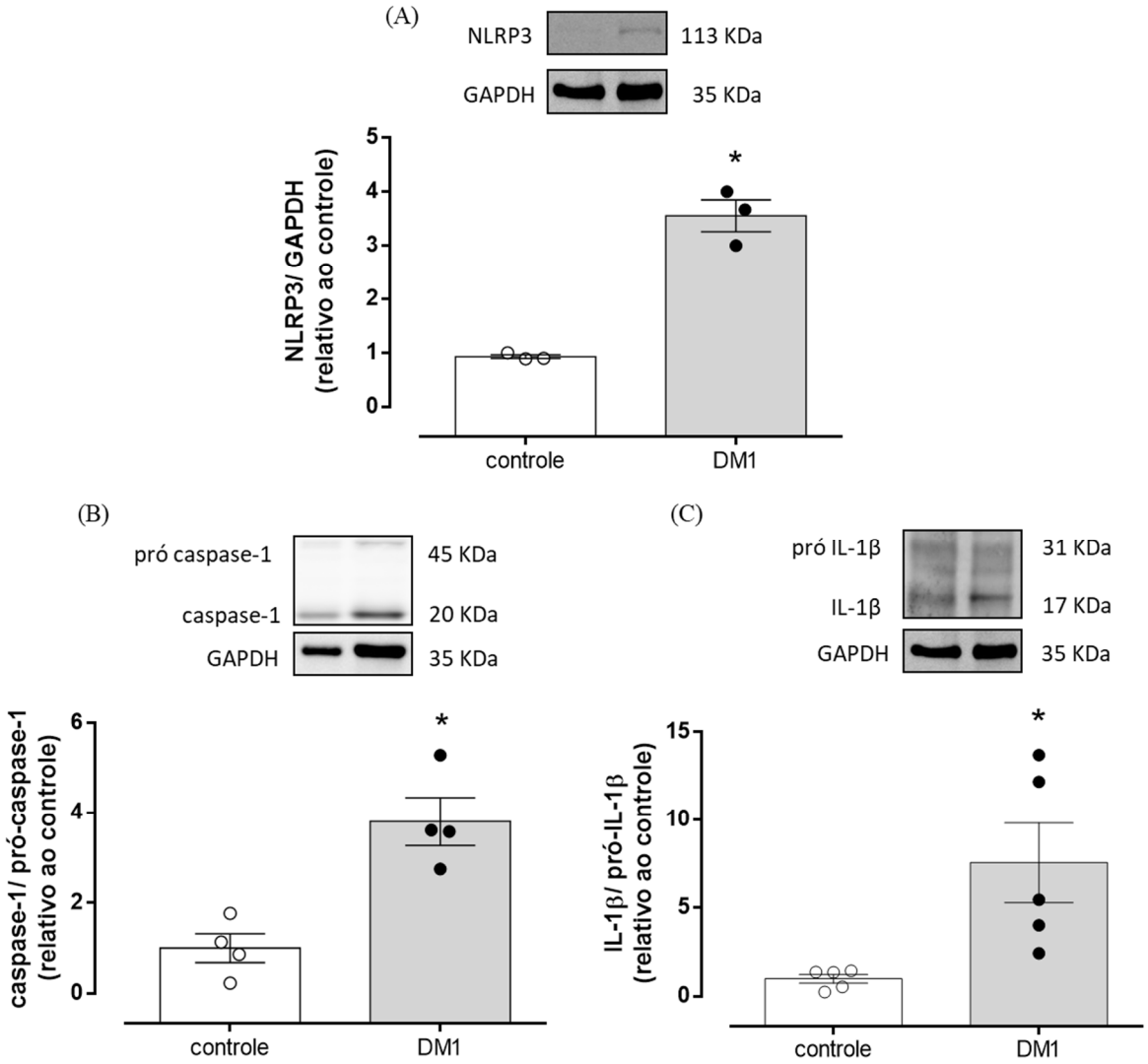


Figura 12 Expressão de (A) NLRP3 e formas pró e clivada de (B) caspase-1 e (C) IL-1β. Na parte superior, imagens representativas de western blot e, na parte inferior, análise densitométrica correspondente à razão da expressão de NLRP3/GAPDH, caspase-1/pró-caspase-1 e IL-1β/pró-IL-1β. As proteínas foram isoladas do leito arterial mesentérico de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=3-5.

Com a confirmação da ativação do inflamassoma NLRP3 na vasculatura de animais diabéticos, primeiramente avaliamos se animais deficientes para NLRP3 apresentam alterações na massa corporal, glicemia e níveis de insulina em condições basais e em resposta ao tratamento com STZ. Em seguida, avaliamos se esta plataforma inflamatória contribui para o processo de disfunção endotelial observado em artérias de animais diabéticos.

5.5. Avaliação dos efeitos da deficiência do receptor NLRP3 sobre a massa corporal, glicemia e níveis de insulina

A deficiência do receptor NLRP3 não alterou a massa corporal (figura 13A), glicemia (figura 13B) ou níveis de insulina (figura 13C) tanto em animais tratados com veículo como em animais tratados com STZ.

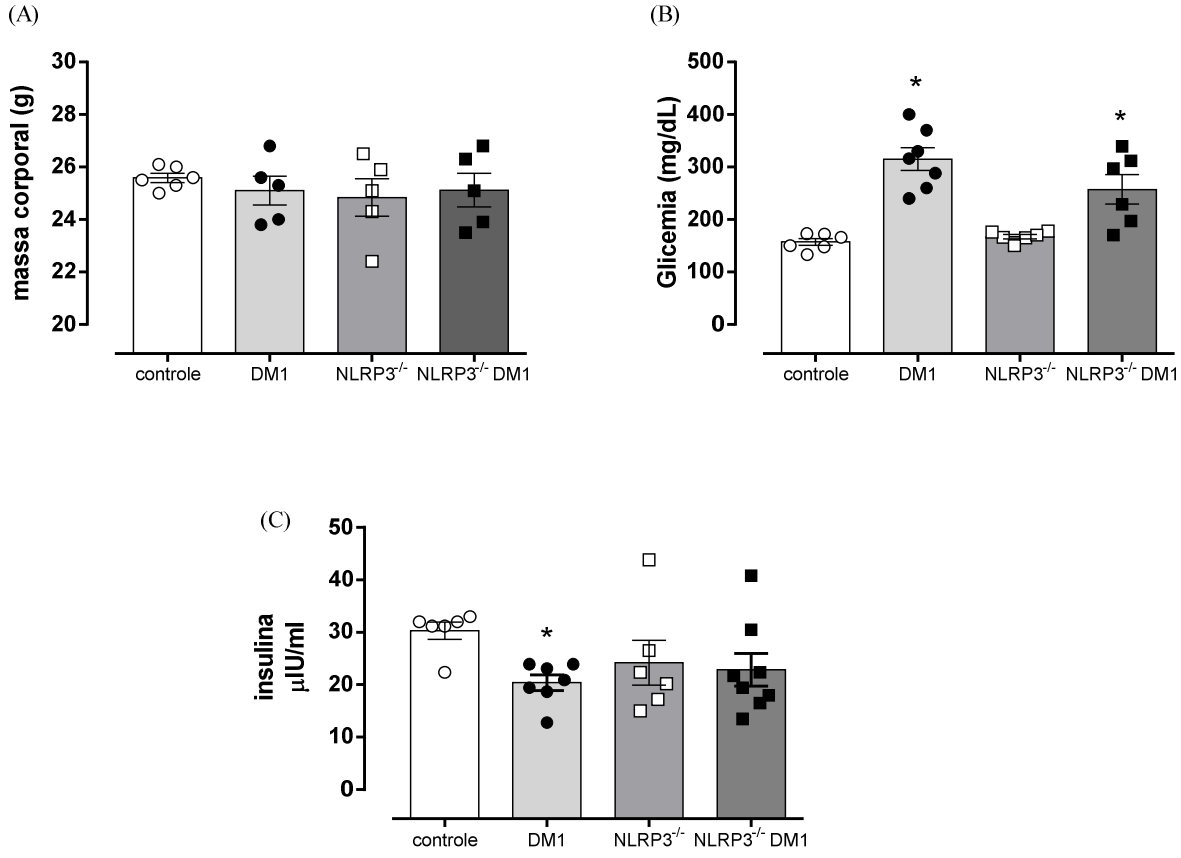


Figura 13 (A) Massa corporal (g), (B) glicemia (mg/dL) e (C) níveis de insulina (µIU/ml) em camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=5-8

Na etapa seguinte, avaliamos se esta plataforma inflamatória participa do processo de disfunção endotelial observado em artérias de animais diabéticos.

5.6. Avaliação da participação do inflamassoma na disfunção endotelial associada ao diabetes

A deficiência do receptor NLRP3 preveniu a redução da resposta vasodilatadora a ACh no diabetes [pD_2, NLRP3$^{-/-}$ DM1 = 6,6 ± 0,1 *vs.* DM1= 6,2 ± 0,2; Rmáx, NLRP3$^{-/-}$ DM1 = 80,8 ± 3,3 *vs.* DM1 = 47,2 ± 4,9; P<0,05] (figura 14A). A incubação das artérias mesentéricas com o inibidor seletivo do NLRP3, MCC950 (10^{-6} M) reverteu parcialmente a redução da resposta de relaxamento a ACh em artérias de animais diabéticos [pD_2, DM1+MCC950 = 6,9 ± 0,2 *vs.* Controle+MCC950 = 6,7 ± 0,1; Rmáx, DM1+MCC950 = 62,5 ± 3,8 *vs.* Controle+MCC950 = 85,6 ± 6,7; P<0,05] (figura 14B).

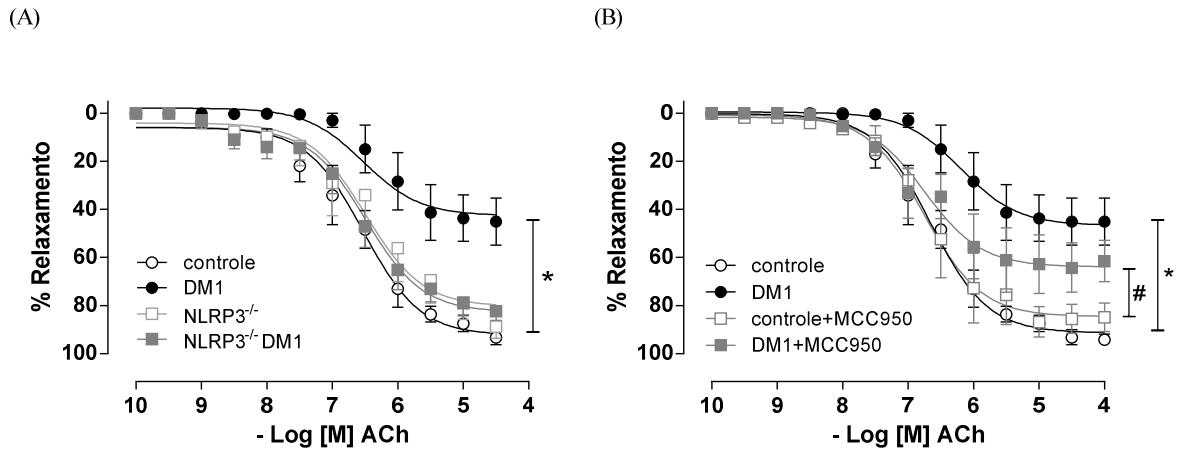


Figura 14 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em (A) artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) e em (B) artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) antes e após a incubação com MCC950 (10^{-6} M). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, #, P<0,05 *vs.* controle+MCC950, N=8-10.

Tabela 5 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) e em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6, antes e após a incubação com MCC950.

	Controle		**DM1**		**NLRP3$^{-/-}$**		**NLRP3$^{-/-}$ DM1**		**Controle+ MCC950**		**DM1+ MCC950**	
	Rmáx	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**
ACh	90,1 ± 3,2	6,7 ± 0,1	47,2 ± 4,9*	6,2 ± 0,2*	83,7 ± 5,9	6,3 ± 0,2	80,8 ± 3,3	6,6 ± 0,1	85,6 ± 3,7	6,7 ± 0,1	62,5 ± 3,8#	6,9 ± 0,2
	(8)		(10)		(7)		(6)		(4)		(5)	

Os valores de Rmáx (Resposta máxima) representam a média ± E.P.M.
pD_2– logaritmo negativo da EC_{50} (concentração que promove 50% da Rmáx)
O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.
*, P<0,05 *vs.* controle, #, P<0,05 *vs.* controle+MCC950

Questionamos então se, além de prevenir a disfunção endotelial - avaliada pelo relaxamento a ACh -, a deficiência para o NLRP3 alteraria a resposta de relaxamento a insulina.

5.7. Avaliação da participação do NLRP3 na redução da resposta vasodilatadora a insulina no diabetes

A deficiência do receptor NLRP3 aumentou a sensibilidade ao relaxamento para insulina em artérias de animais tratados com veículo [pD_2, NLRP3$^{-/-}$ = 9,1 ± 0,2 *vs.* controle = 7,6 ± 0,1; P<0,05] e, ainda, preveniu a redução da vasodilatação a insulina induzida pelo diabetes [Rmáx, NLRP3$^{-/-}$ DM1= 68,6 ± 5,7 *vs.* DM1 = 30,3 ± 3,3; P<0,05] (figura 15A). A incubação com L-NAME reduziu a vasodilatação induzida pela insulina e aboliu as diferenças de relaxamento entre os grupos (figura 15B).

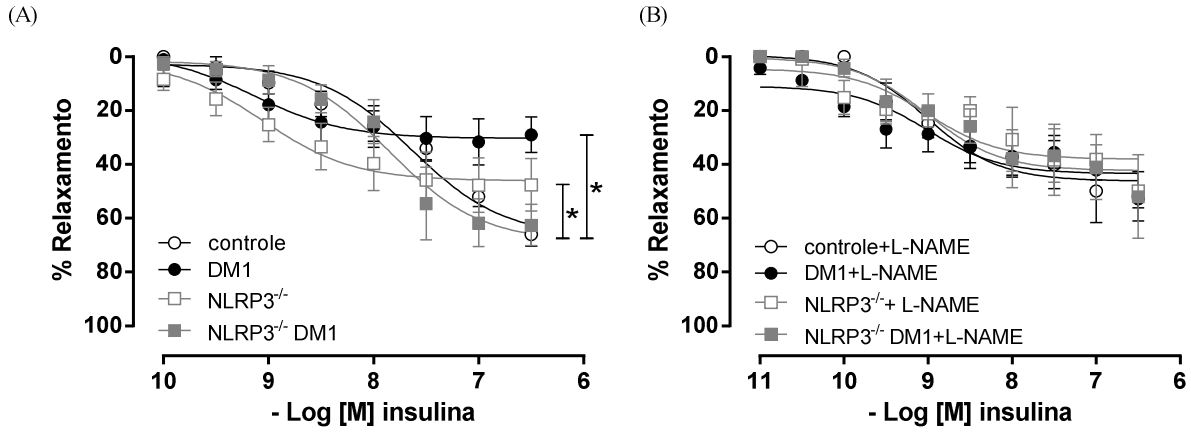


Figura 15 Curvas concentração-resposta para insulina em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1), (A) antes e (B) após a incubação com L-NAME (10^{-4} M). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=5-6.

Tabela 6 Resposta Máxima e sensibilidade a insulina em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1) antes e após a incubação com L-NAME.

	Controle		**DM1**		**NLRP3$^{-/-}$**		**NLRP3$^{-/-}$ DM1**	
	Rmáx	**pD$_2$**	**Rmáx**	**pD$_2$**	**Rmáx**	**pD$_2$**	**Rmáx**	**pD$_2$**
insulina	66,8 ± 4,2	7,6 ± 0,1	30,3 ± 3,3*	9,1 ± 0,3*	46,1 ± 3,9*	9,1 ± 0,2*	68,6 ± 5,7	7,8 ± 0,1
	(5)		(6)		(5)		(5)	
	Controle+ L-NAME		**DM1+ L-NAME**		**NLRP3$^{-/-}$+ L-NAME**		**NLRP3$^{-/-}$ DM1+ L-NAME**	
	Rmáx	**pD$_2$**	**Rmáx**	**pD$_2$**	**Rmáx**	**pD$_2$**	**Rmáx**	**pD$_2$**
insulina	45,7 ± 3,5	9,1 ± 0,2	40,8 ± 2,6	9,6 ± 0,3	42,0 ± 4,8	8,5 ± 0,3	43,5 ± 4,8	8,8 ± 0,3
	(5)		(6)		(5)		(5)	

Os valores de Rmáx (Resposta máxima) representam a média ± E.P.M.
pD$_2$– logaritmo negativo da EC$_{50}$ (concentração que promove 50% da Rmáx)
O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.
*, P<0,05 *vs.* controle

Como a deficiência do NLRP3 preveniu a disfunção endotelial induzida pelo diabetes, avaliamos se a ativação deste receptor também estaria envolvida na ativação da resposta inflamatória na vasculatura medida pela produção de caspase-1 e IL-1β.

5.8. Avaliação da participação do NLRP3 na ativação vascular de caspase-1 e IL-1β

A ativação de caspase-1 [U.A, NLRP3$^{-/-}$ DM1 = 2,0 ± 0,5 *vs.* DM1 = 3,6 ± 0,3; P<0,05] (figura 16A) e IL-1β [U.A, NLRP3$^{-/-}$ DM1 = 1,0 ± 1,3 *vs.* DM1 = 5,5 ± 2,2; P<0,05] observada em artérias de camundongos C57Bl/6 tratados com STZ (figura 16B) foi prevenida em artérias de animais diabéticos deficientes para NLRP3.

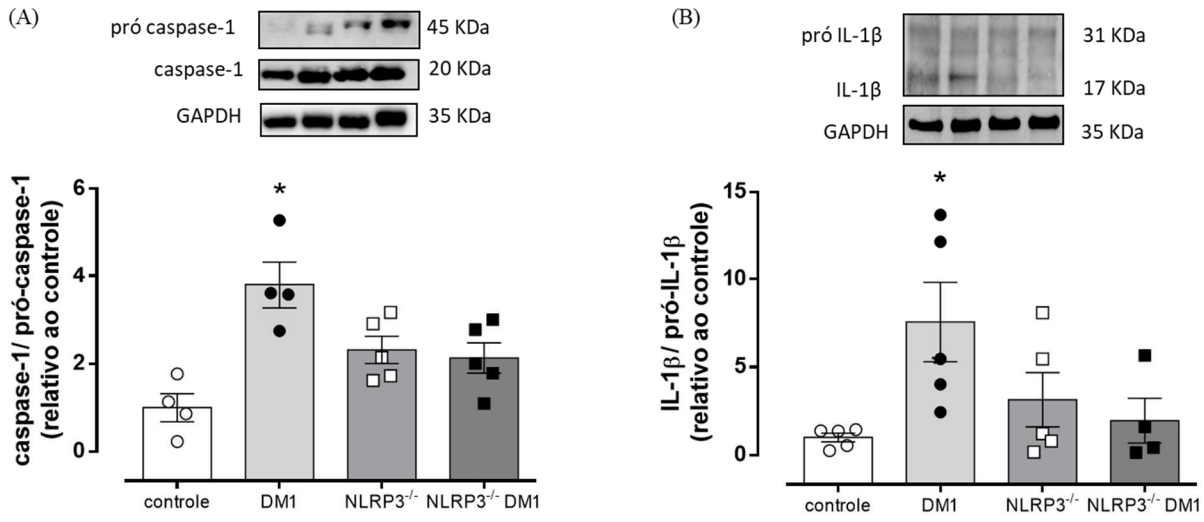


Figura 16 Expressão vascular de (A) caspase-1 e (B) IL-1β nas suas formas pró e clivada. Na parte superior, imagens representativas de western blot e, na parte inferior, análise densitométrica correspondente à razão da expressão de caspase-1/pró-caspase-1 e IL-1β/pró-IL-1β. As proteínas foram isoladas do leito arterial mesentérico de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=4-5.

Estes resultados nos levaram então a buscar quais seriam os mecanismos envolvidos na prevenção da disfunção endotelial e da inflamação vascular observada nos animais deficientes para NLRP3.

Um dos mecanismos envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3, e que está exacerbado no diabetes, é o aumento de EROs ou estresse oxidativo. Então, no próximo passo, avaliamos a geração de EROs no leito mesentérico de animais controle e diabéticos.

5.9. Avaliação da geração de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no diabetes

O diabetes promoveu aumento significativo na geração de ânion superóxido [U.A., DM1 = 2,1 ± 0,4 *vs.* controle = 1,0 ± 0,1; P<0,05] (figura 17A) e de H_2O_2 [U.A., DM1 = 2,0 ± 0,4 *vs.* controle = 1,0 ± 0,1; P<0,05] (figura 17B) no leito mesentérico de animais C57Bl/6.

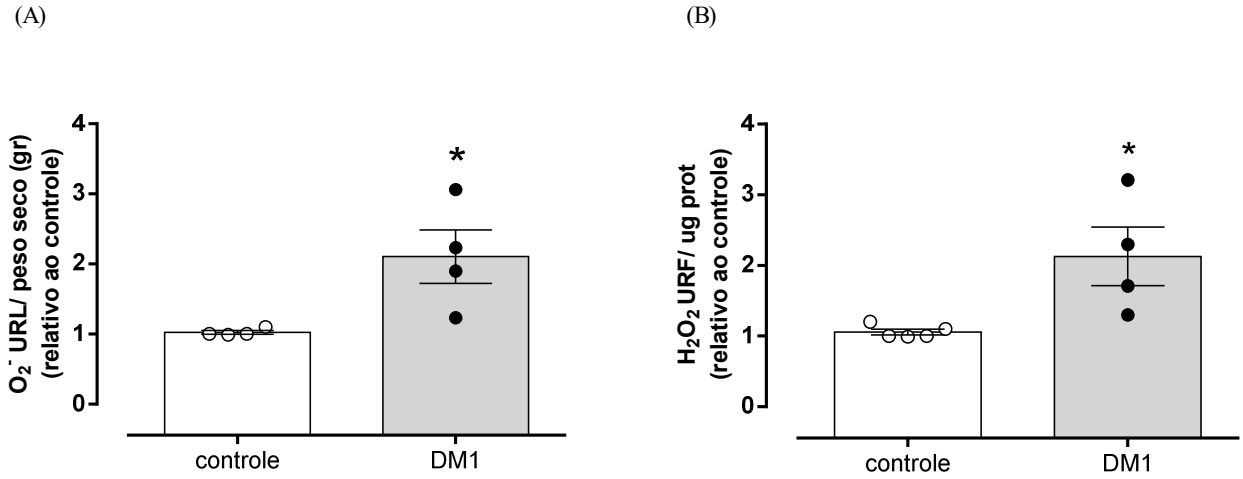


Figura 17 Geração de (A) ânion superóxido (O_2^-) e (B) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no leito mesentérico de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=4-5.

Como observamos aumento na geração de EROs no leito mesentérico dos animais diabéticos, investigamos o envolvimento do aumento de EROs na disfunção endotelial.

5.10. Avaliação da participação de O_2^- e H_2O_2 na disfunção endotelial associada ao diabetes

O prejuízo da resposta de relaxamento dependente do endotélio em artérias de animais diabéticos foi revertido após incubação com varredor de ânion superóxido, Tiron [pD_2, DM1+Tiron = 6,6 ± 0,1 *vs.* controle+Tiron = 6,8 ± 0,1; Rmáx, DM1+Tiron = 78,4 ± 3,1 *vs.* controle+Tiron = 70,6 ± 1,5; P<0,05] (figura 18A) e pela incubação com mimético da catalase, peg-catalase [pD_2, DM1+Peg-catalase = 6,4 ± 0,1 *vs.* controle+Peg-catalase = 6,8 ± 0,2; Rmáx, DM1+ Peg-catalase = 86,4 ± 2,8 *vs.* controle+ Peg-catalase = 78,0 ± 4,4; P<0,05] (figura 18B).

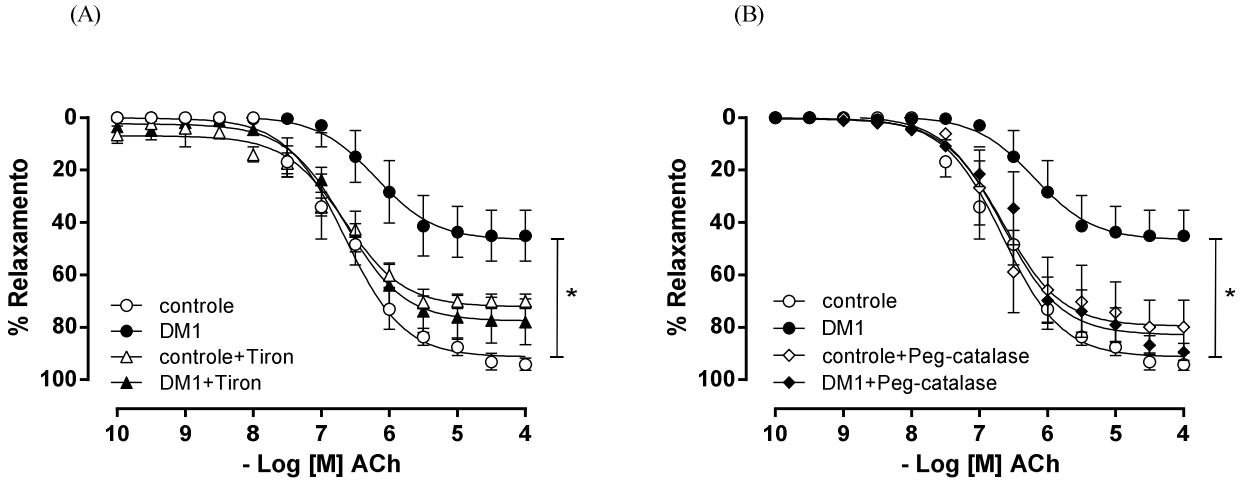


Figura 18 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1), antes e após incubação com (A) Tiron (10^{-4} M) e (B) peg-catalase (200 U/ml). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=6-7.

Tabela 7 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1) antes e após incubação com Tiron ou Peg-catalase.

	Controle		**DM1**		**Controle+ Tiron**		**DM1+ Tiron**		**Controle+ Peg-catalase**		**DM1+ Peg-catalase**	
	Rmáx	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**
ACh	90,1 ± 3,2	6,7 ± 0,1	47,2 ± 4,9*	6,2 ± 0,2*	70,5 ± 1,4	6,8 ± 0,1	78,4 ± 3,1	6,6 ± 0,1	78,0 ± 4,5	6,8 ± 0,2	86,4 ± 2,8	6,4 ± 0,1
	(8)		(10)		(5)		(5)		(8)		(5)	

Os valores de Rmáx (Resposta máxima) representam a média ± E.P.M.
pD_2– logaritmo negativo da EC_{50} (concentração que promove 50% da Rmáx)
O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.
*, P<0,05 *vs.* controle

Como observamos que o aumento de EROs contribui para a disfunção endotelial no diabetes, investigamos a geração de EROs na vasculatura de animais deficientes para NLRP3.

5.11. Avaliação da participação do NLRP3 na geração de O_2^- e H_2O_2 no diabetes

A deficiência do NLRP3 preveniu a geração de O_2^- [U.A., DM1 NLRP3$^{-/-}$ = 0,1 ± 0,1 *vs.* DM1 = 2,1 ± 0,4; P<0,05] (figura 19A) e de H_2O_2 [U.A., DM1 NLRP3$^{-/-}$ = 0,4 ± 0,2 *vs.* DM1 = 2,1 ± 0,4; P<0,05] (figura 19B) no leito mesentérico de animais diabéticos.

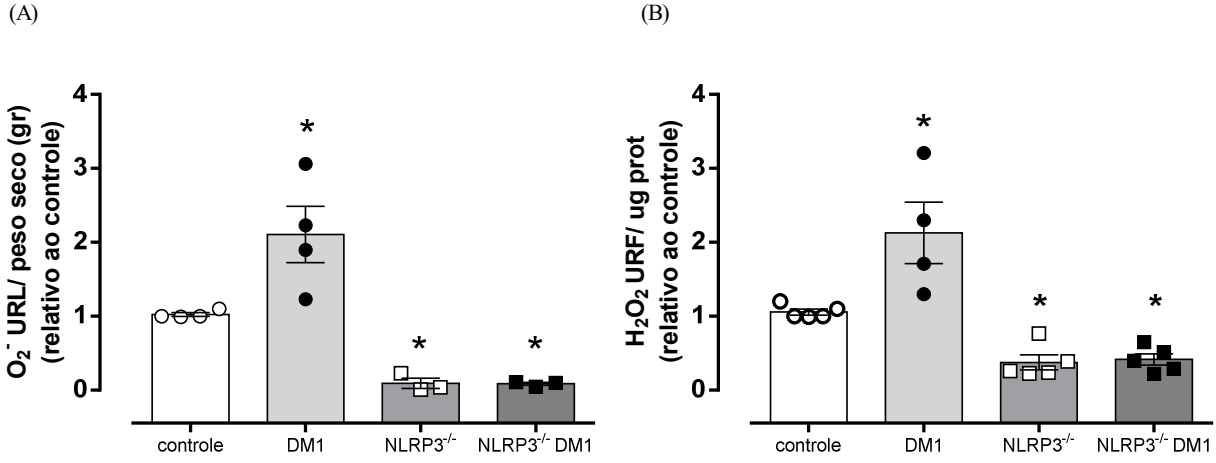


Figura 19 Geração de (A) ânion superóxido (O_2^-) e (B) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no leito mesentérico de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=3-5.

Nos perguntamos então se animais deficientes de NLRP3 apresentariam alterações na expressão vascular de enzimas antioxidantes e pró-oxidantes, o que poderia influenciar a geração de EROs.

5.12. Avaliação da expressão vascular de NOX-1, NOX-4, SOD-1 e Catalase

O diabetes não alterou a expressão vascular de NOX-1 ou catalase (figuras 20A e 20D). Entretanto, observamos aumento na expressão de SOD-1 [U.A., DM1 = 1,5 ± 0,1 *vs.* controle = 1,0 ± 0,1; P<0,05] em camundongos diabéticos, o que foi prevenido em artérias de animais NLRP3$^{-/-}$ (figura 20C). Além disso, animais NLRP3$^{-/-}$ apresentaram redução da expressão vascular de NOX-4 em comparação a artérias de animais C57Bl/6 controles e diabéticos [U.A., NLRP3$^{-/-}$ = 0,5 ± 0,1 *vs.* controle = 1,0 ± 0,1; P<0,05] (figura 20B).

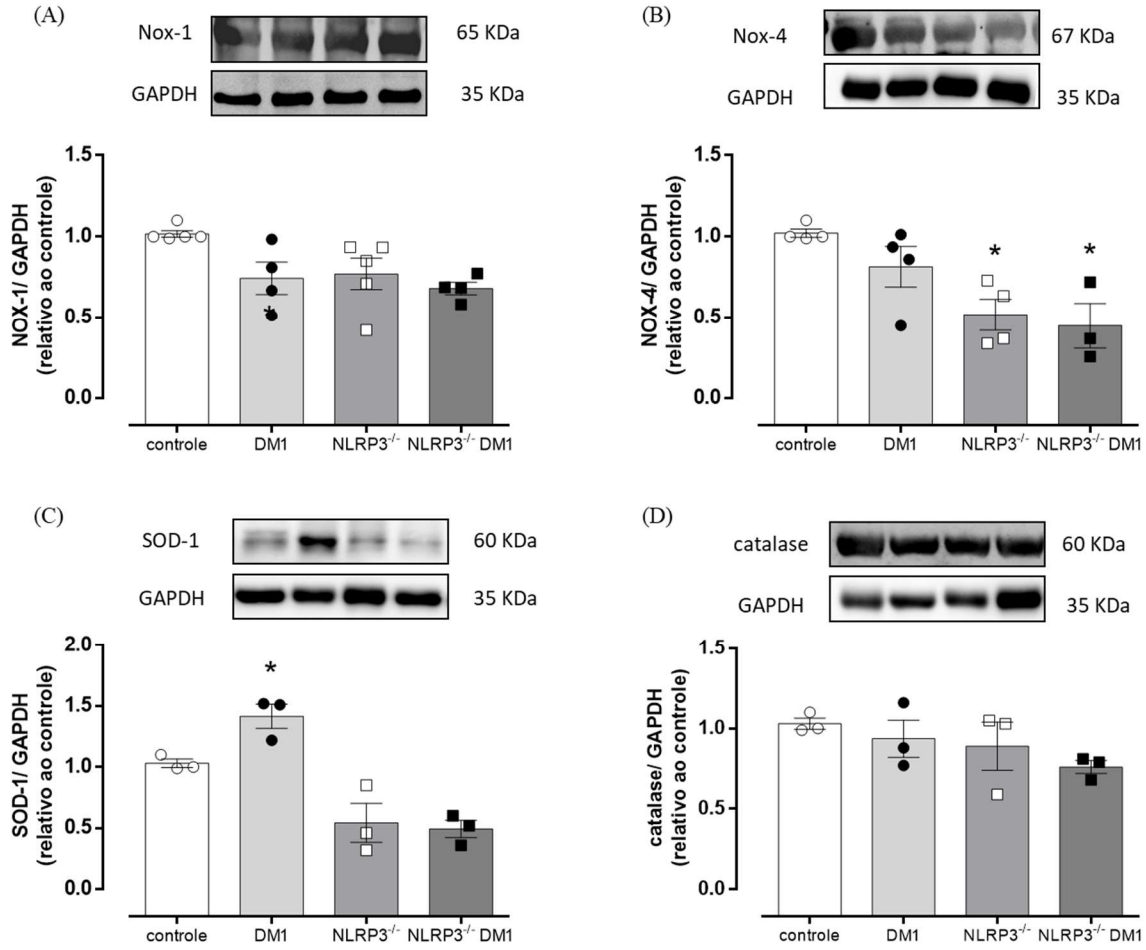


Figura 20 Expressão de (A) NOX-1, (B) NOX-4, (C) SOD-1 e (D) catalase. Na parte superior, imagens representativas de western blot e, na parte inferior, análise densitométrica correspondente à razão da expressão de NOX-1, NOX-4, SOD-1 e catalase /GAPDH. As proteínas foram isoladas do leito arterial mesentérico de camundongos C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=3-5.

Além da expressão de enzimas anti- e pró-oxidantes, também avaliamos a expressão gênica de moléculas de adesão envolvidas com a resposta inflamatória vascular, como VCAM-1 e ICAM-1.

5.13. Avaliação da participação do NLRP3 na expressão gênica de VCAM-1 e ICAM-1

O diabetes não alterou a expressão gênica de moléculas de adesão como VCAM-1 e ICAM-1 em artérias de animais C57Bl/6. Entretanto, a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 foi significativamente menor em artérias de animais deficientes de NLRP3 respectivamente [U.A., NLRP3$^{-/-}$ = 0,001 ± 0,1 *vs.* controle = 0,13 ± 0,1; NLRP3$^{-/-}$ = 0,07 ± 0,1 *vs.* controle = 0,3 ± 0,1P<0,05] (figuras 21A e 21B).

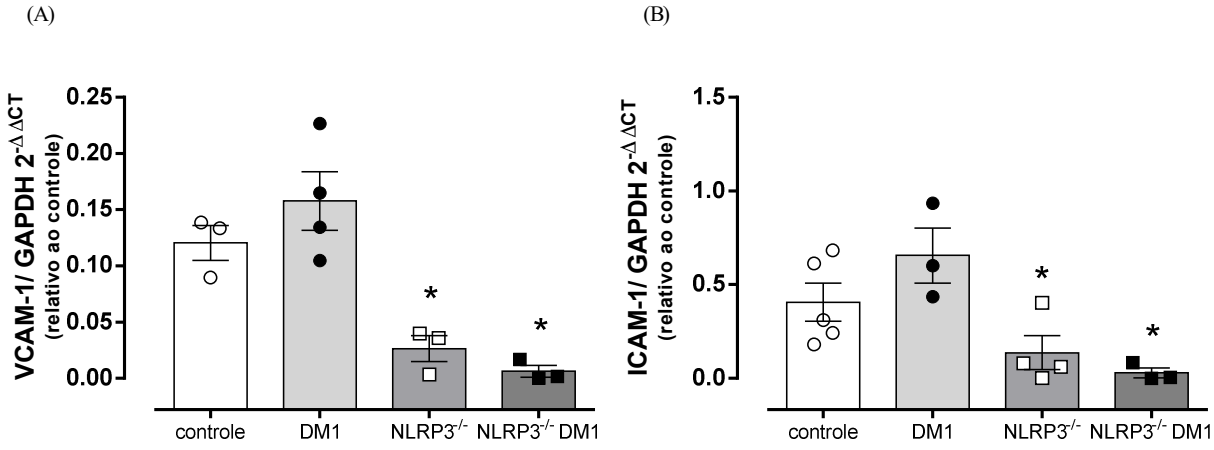


Figura 21 Expressão gênica de (A) VCAM-1 e (B) ICAM-1 normalizadas pela expressão de GAPDH no leito mesentérico de animais C57Bl/6 e NLRP3$^{-/-}$ tratados com veículo (controle e NLRP3$^{-/-}$) ou estreptozotocina (DM1 e NLRP3$^{-/-}$ DM1). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=3-5.

A ativação do inflamassoma NLRP3 pode ser desencadeada por diversos mecanismos, incluindo sua ativação por DAMPs. Como citado anteriormente, o DNA mitocondrial, um tipo de DAMP, é capaz de induzir ativação do inflamassoma NLRP3. Resultados do laboratório da Profa. Daniela Carlos demonstraram que o diabetes aumenta o DNA mitocondrial circulante (Carlos *et al.*, 2017). Dessa forma, no próximo passo avaliamos a liberação do DNA mitocondrial citosólico no pâncreas e no mesentério, ou seja, o DNA mitocondrial que poderia ser extravasado do núcleo em uma situação de necrose e apoptose e, consequentemente, ser liberado para circulação, o que poderia explicar o aumento do DNA mitocondrial circulante no diabetes.

5.14. Avaliação de DNA mitocondrial no citosol de células pancreáticas e mesentéricas

Houve aumento na liberação de DNA mitocondrial na fração citosólica do pâncreas de animais diabéticos (figura 22A). Entretanto, não houve diferença nos níveis de DNA mitocondrial no citosol de células do leito mesentérico de animais diabéticos (figura 22B).

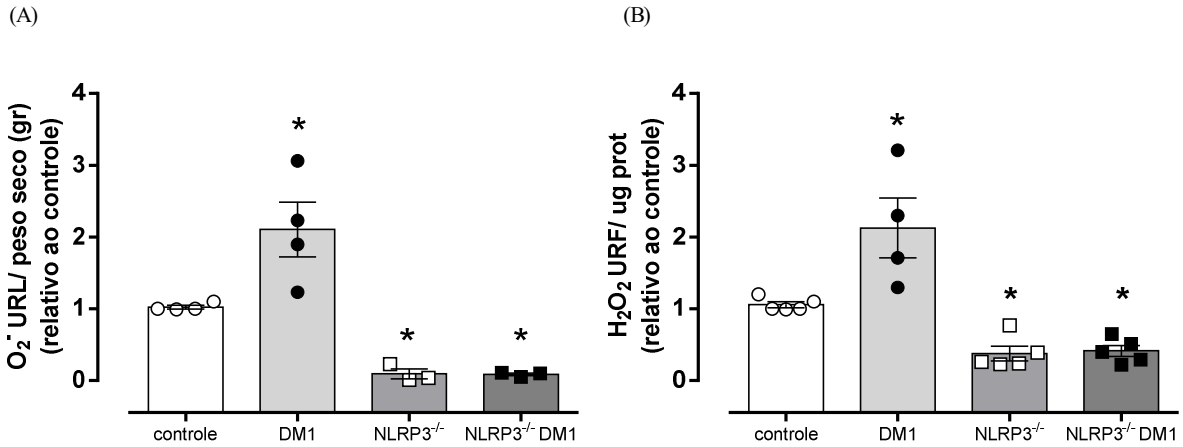


Figura 22 Quantificação dos genes do DNA mitocondrial, NADH desidrogenase (NADH), citocromo B (Cit B) e citocromo C (Cit C) na (A) fração citosólica de células do pâncreas e (B) fração citosólica do leito mesentérico de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1). Determinação realizada por RT-PCR. Cada barra representa a média ± E.P.M. *P<0,05 *vs.* controle, N=3-5.

Como encontramos aumento de DNAm circulante em animais diabéticos (Carlos et. al. 2017) e também maior liberação citosólica de DNA mitocondrial pancreático, investigamos se o DNAm extraído do pâncreas, tecido este que sofre necrose e apoptose durante o diabetes, seria capaz de induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 em células de músculo liso vascular.

5.15. Avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 em células de músculo liso vascular (CMLV) por DNA mitocondrial

DNA mitocondrial pancreático de animais diabéticos, mas não DNA mitocondrial pancreático de animais controle, aumentou significativamente a atividade de caspase-1 [U.A., DNAmd = 1,4 ± 0,1 *vs.* veículo = 0,5 ± 0,1; P<0,05] (figura 23A). A incubação com DNAmc e DNAmd não induziu mudanças significativas na ativação de IL-1β (figura 23B).

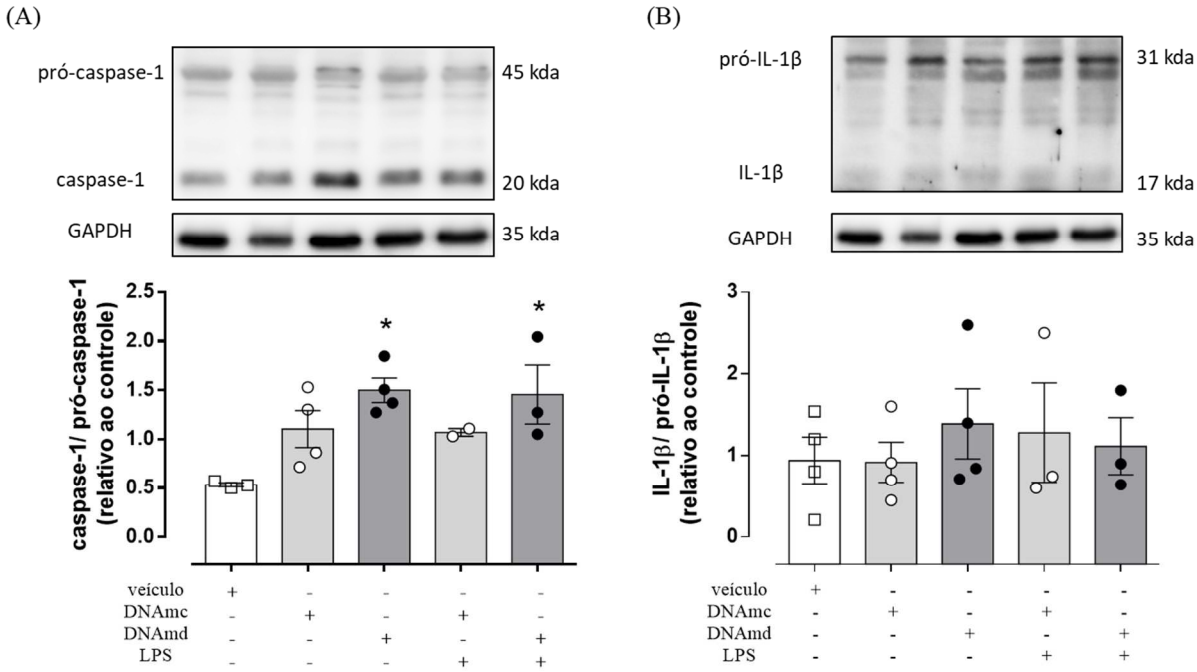


Figura 23 Expressão de (A) caspase-1 e (B) IL-1β nas suas formas pró e clivada. Na parte superior, imagens representativas de western blot e, na parte inferior, análise densitométrica correspondente à razão da expressão de caspase-1/pró-caspase-1 e IL-1β/pró-IL-1β. As proteínas foram isoladas de CMLV incubadas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 µg/ml) na presença de veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, p<0,05 *vs.* veículo, N=3-4.

Como encontramos aumento de caspase-1 em CMLV via ativação de DNA mitocondrial, avaliamos se esta ativação estava ocorrendo via inflamassoma NLRP3, uma vez que outros tipos de Nalp, como NLRP1, podem ativar a produção de caspase-1 e IL-1β. Desta forma, cultivamos CMLV provenientes do leito mesentérico de animais deficientes de NLRP3, as quais foram primadas ou não com LPS por 24 horas e estimuladas com veículo ou DNA mitocondrial extraído do pâncreas de animais controle e diabéticos por 1 hora.

5.16. Avaliação da participação do NLRP3 na ativação de caspase-1 via DNAm em CMLV

A incubação de CMLV provenientes de animais deficientes para NLRP3 com o DNAm de animais controle e diabéticos não induziu ativação significativa de caspase-1 (figura 24).

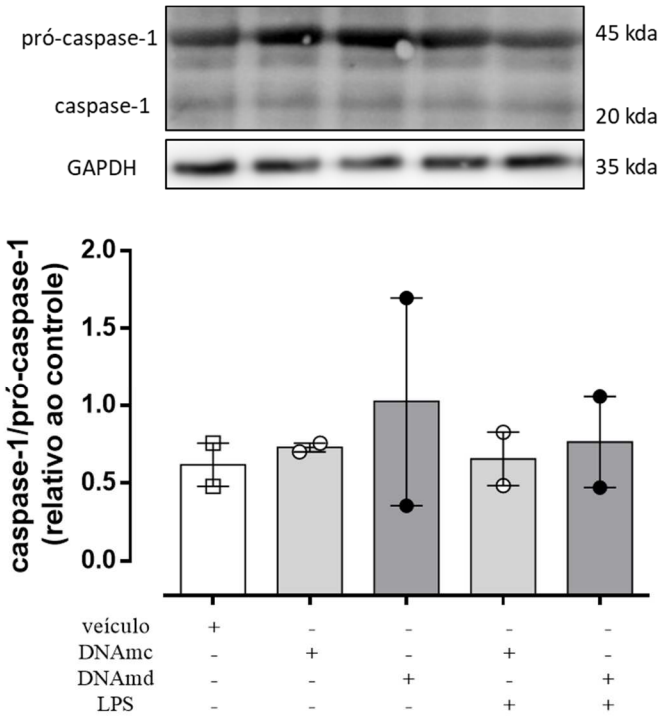


Figura 24 Expressão de caspase-1 nas suas formas pró e clivada. Na parte superior, imagens representativas de western blot e, na parte inferior, análise densitométrica correspondente à razão da expressão de caspase-1/pró-caspase-1. As proteínas foram isoladas de CMLV provenientes de camundongos deficientes de NLRP3 incubadas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 µg/ml) na presença de veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, $p<0,05$ *vs.* veículo, N=2.

A ausência de ativação de caspase-1 em CMLV provenientes de animais deficientes de NLRP3 corroborou com nossa hipótese que esta ativação ocorre via inflamassoma NLRP3. Desta forma, avaliamos qual mecanismo levaria à ativação do inflamassoma NLRP3. Considerando que DNAm promove ativação de TLR-9, este foi o alvo de nosso próximo protocolo.

5.17. Avaliação da participação do TLR-9 na ativação de caspase-1 via DNAm em CMLV

A incubação prévia com antagonista do TLR-9, ODN 2088, não inibiu a ativação de caspase-1 produzida por DNAm de animais diabéticos em CMLV (figura 25).

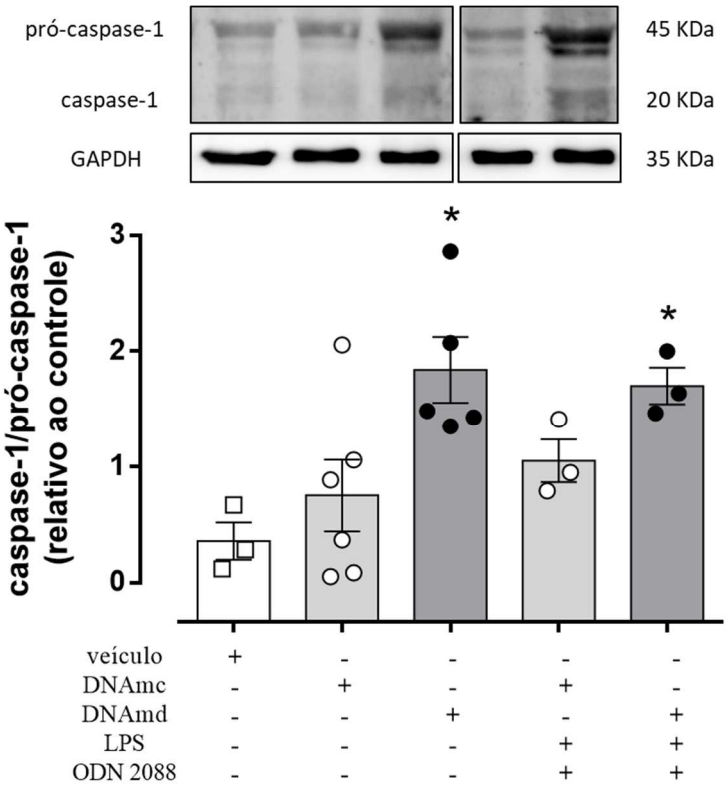


Figura 25 Expressão de caspase-1 nas suas formas pró e clivada. Na parte superior, imagens representativas de western blot e, na parte inferior, análise densitométrica correspondente à razão da expressão de caspase-1/pró-caspase-1. As proteínas foram isoladas de CMLV incubadas com DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente) na presença de veículo e ODN 2088 (10 µg/ml). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, $p<0,05$ *vs.* veículo, N=3-6.

Como a ativação de caspase-1 não foi prevenida pela presença do antagonista de TLR-9, investigamos outro mecanismo associado à ativação do inflamassoma NLRP3, a geração de EROs.

5.18. Avaliação da geração de EROs via DNAm em CMLV

Apenas a incubação de CMLV com o DNAmd aumentou a geração de EROs, avaliada pela luminescência para a lucigenina [Unidades Relativas de Luminescência (URL)/ug prot., DNAmd = 2184 ± 573 *vs.* veículo = 822 ± 77,8; P<0,05] figura (26A), ou pela fluorescência para DHE [U.A., DNAmd = 25,1 ± 1,8 *vs.* veículo = 15,0 ± 1,8; P<0,05]. Este aumento foi revertido pela incubação com Tiron [U.A., DNAmd+Tiron = 13,5 ± 1,2 *vs.* DNAmd = 25,1 ± 1,8; P<0,05] e, ainda, pela incubação com CCCP, desacoplador da cadeia respiratória mitocondrial [U.A., DNAmd+CCCP= 16,3 ± 0,1 *vs.* DNAmd = 25,1 ± 1,8; P<0,05] (figura 26B).

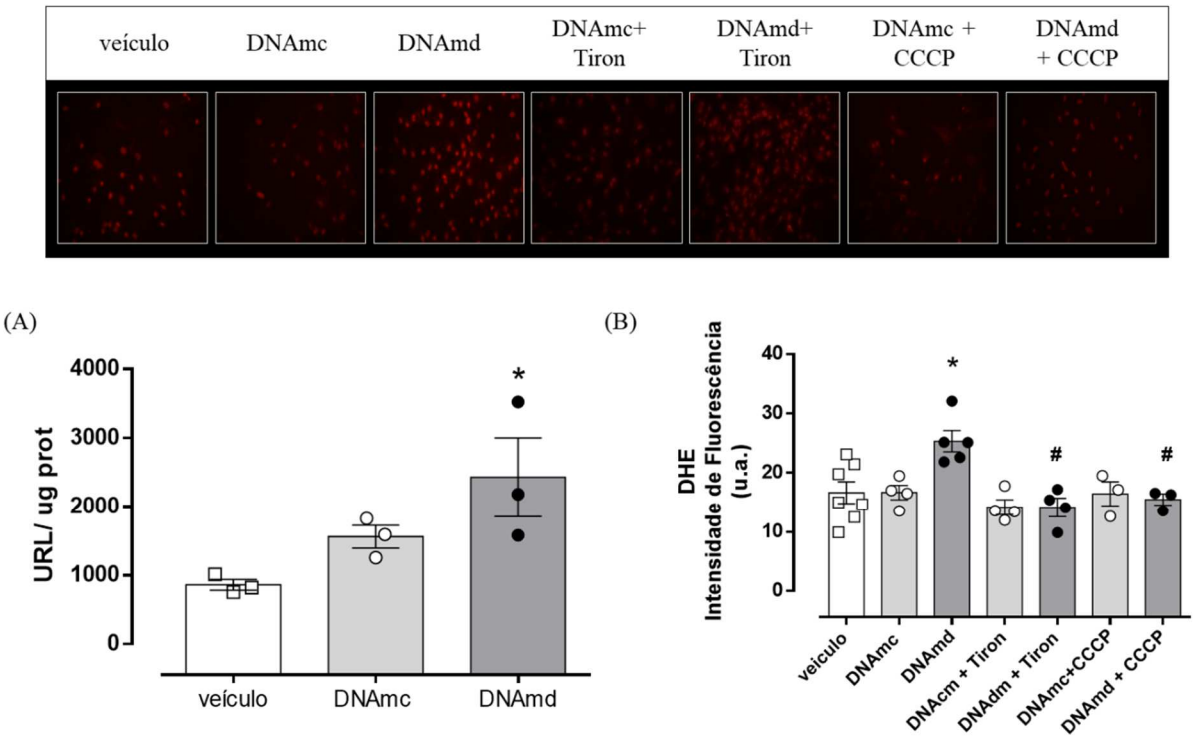


Figura 26 Geração de ânion superóxido. (A) Luminescência para lucigenina e (B), na parte superior, imagens representativas de fluorescência derivada de Dihidroetidio (DHE; 5 µM) e, na parte inferior, gráfico de barras. As CMLV foram incubadas com DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente) na presença de veículo, Tiron (10^{-4} M) e CCCP (10^{-6} M). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* veículo, #, P<0,05 *vs.* DNAmd, N=3-7.

Um dos mecanismos associados ao aumento da geração de EROs, ou estresse oxidativo, é o aumento dos níveis intracelulares de cálcio. Dessa forma, também avaliamos se o DNAm poderia aumentar os níveis intracelulares de cálcio em CMLV.

5.19. Avaliação do efeito do DNA mitocondrial sobre o influxo de Ca^{2+} em CMLV

A incubação com DNAmd, mas não com DNAmc, aumentou o influxo de cálcio em CMLV estimuladas com ATP (10^{-5} M) [Unidades Relativas de Fluorescência (URF), DNAmd = 498 ± 36,4 *vs.* veículo = 339,7 ± 22,5; P<0,05] (figura 27).

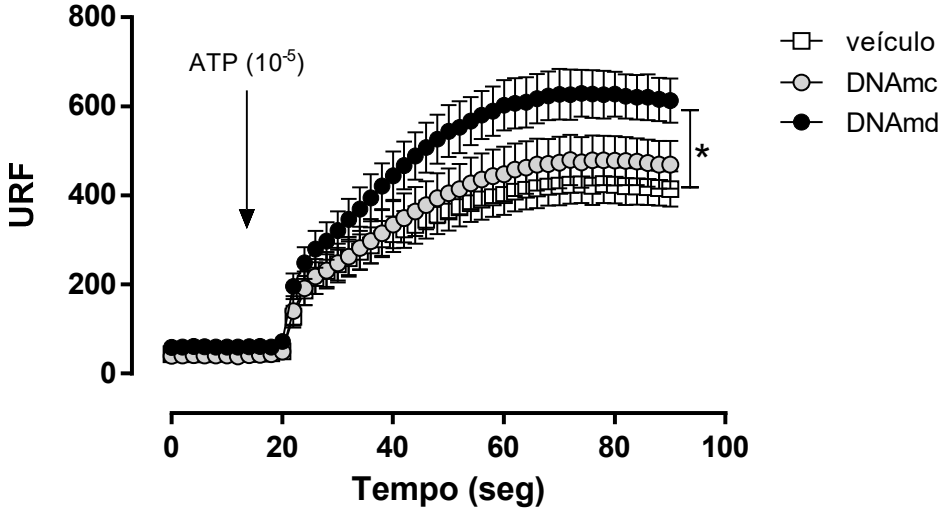


Figura 27 Fluorescência para o influxo de Ca^{2+} em CMLV incubadas com veículo, DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente) e estimuladas com ATP (10^{-5} M). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* veículo, N=6-7.

Este conjunto de resultados sugere que o DNAmd ativa o inflamassoma NLRP3 em CMLV pelo influxo de cálcio e pela geração de EROs. Questionamos então a possível consequência desta ativação para a musculatura lisa.

Como citado em nossa introdução, uma das funções induzidas pela ativação da caspase-1 é a apoptose celular. Então, desta forma, decidimos avaliar a expressão de proteínas envolvidas no processo de apoptose na vasculatura dos nossos animais.

5.20. Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na apoptose no diabetes

O diabetes promoveu aumento da expressão proteica de BAX, proteína pró-apoptótica [U.A., DM1 = 2,1 ± 0,5 *vs.* controle = 1,0 ± 0,2; P<0,05] (figura 28A) e de Cit C, um componente da mitocôndria [U.A., DM1 = 1,6 ± 0,1 *vs.* controle = 0,9 ± 0,1; P<0,05] (figura 28D) em artérias mesentéricas. O diabetes não alterou a expressão de BCl-2 (figura 28B) ou VDAC (figura 28C).

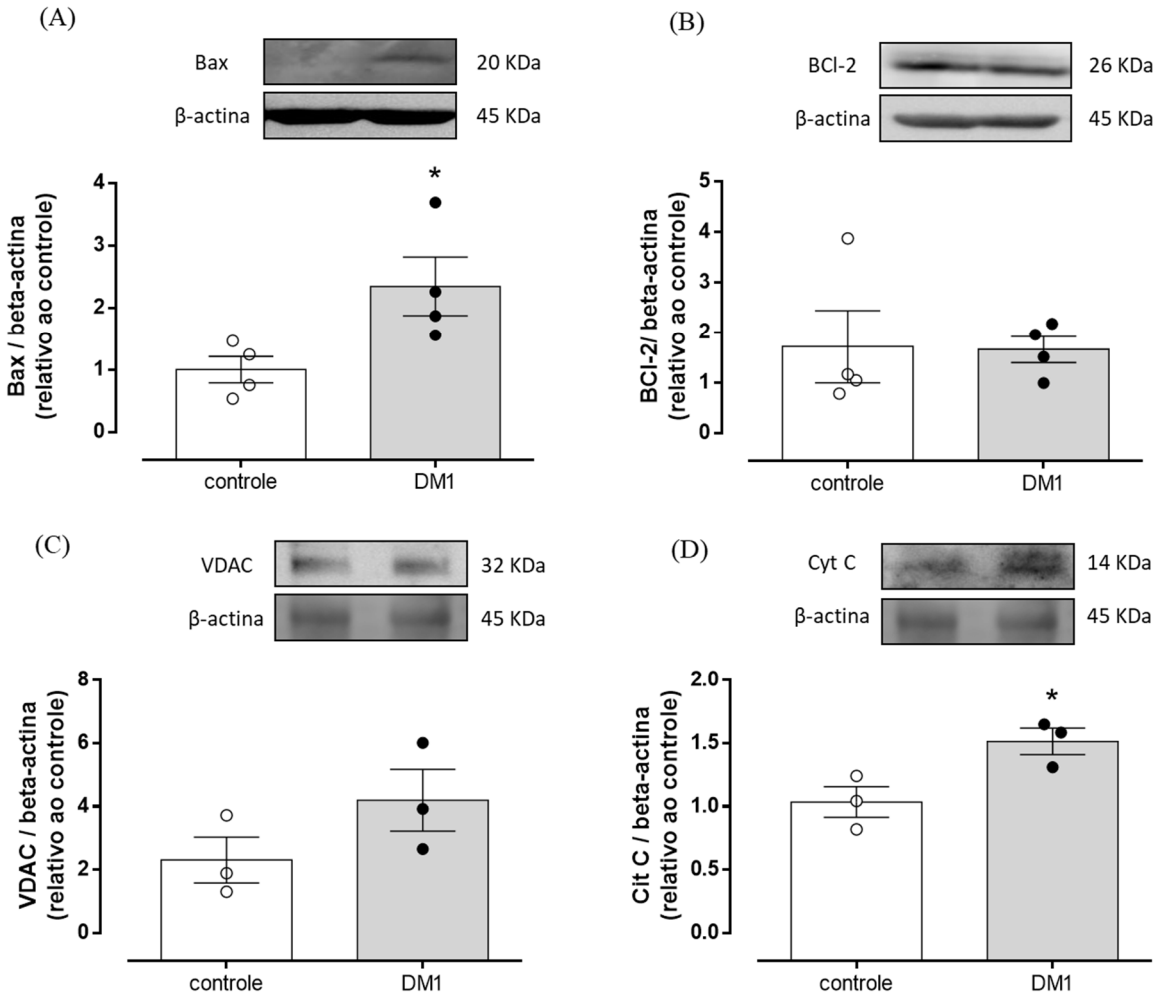


Figura 28 Expressão vascular de (A) BAX, (B) BCl-2, (C) VDAC e (D) Cit C. Na parte superior, imagens representativas de western blot e, na parte inferior, análise densitométrica correspondente à razão da expressão de BAX, BCl-2, VDAC e Cit C /Beta-actina. As proteínas foram isoladas do leito arterial mesentérico de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* controle, N=3-4.

Como o foco do nosso trabalho é investigar mecanismos relacionados à disfunção endotelial, avaliamos se os efeitos induzidos pelo DNAm em células de músculo liso vascular também são observados em células endoteliais. Para tal, utilizamos como ferramenta uma linhagem imortalizada de células endoteliais, células Eahy926.

5.21. Avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 pelo DNAm em células endoteliais

A incubação de células endoteliais com DNAm de animais controle e diabéticos não promoveu ativação de caspase-1 ou de IL-1β. Entretanto, quando as células foram pre-incubadas com LPS por 24 horas (previamente à incubação com DNA mitocondrial), apenas o DNAmd induziu ativação significativa de caspase-1 [U.A., LPS+DNAmd = 1,5 ± 0,2 *vs.* veículo = 0,8 ± 0,1; P<0,05] (figura 29A) e IL-1β [U.A., LPS+DNAmd = 1,6 ± 0,2 *vs.* veículo = 1,0 ± 0,1; P<0,05] (figura 29B).

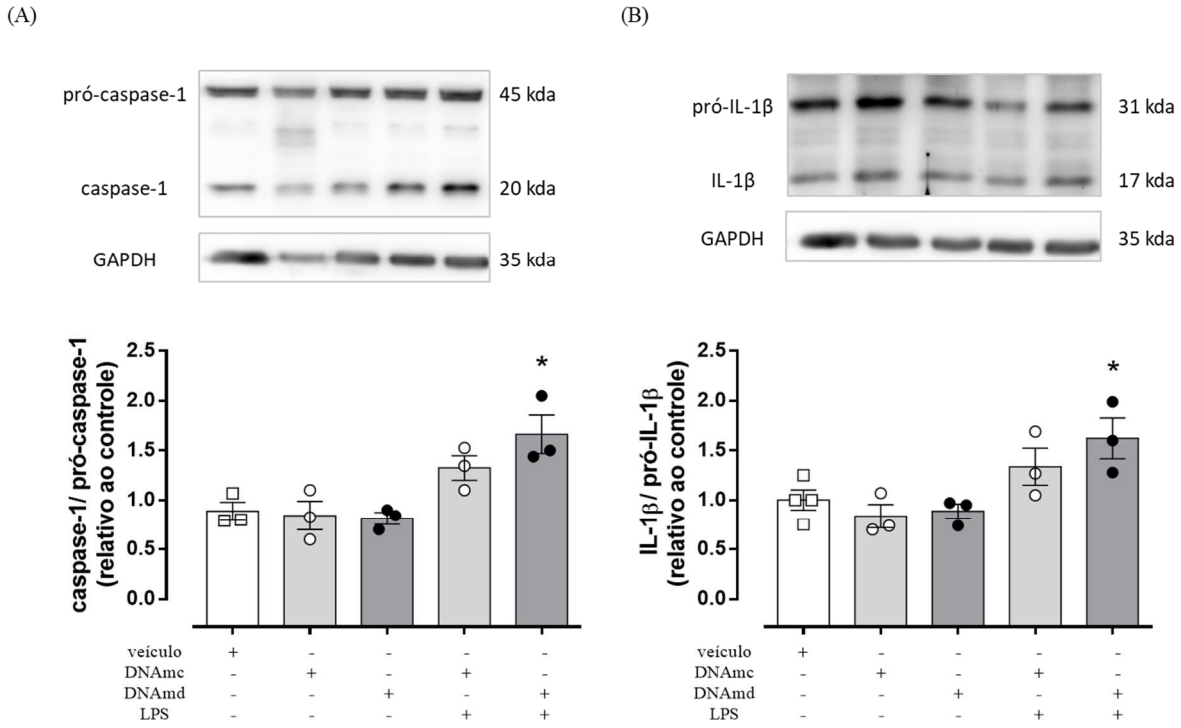


Figura 29 Expressão de (A) caspase-1 e (B) IL-1β nas suas formas pró e clivada. Na parte superior, imagens representativas de western blot e, na parte inferior, análise densitométrica correspondente à razão da expressão de caspase-1/pró-caspase-1. As proteínas foram isoladas de células endoteliais (Eahy926) incubadas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 µg/ml) na presença de veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, p<0,05 *vs.* veículo, N=3-4.

Assim como em CMLV, também avaliamos a geração de EROs em células endoteliais expostas a DNAm.

5.22. Avaliação da geração de EROs via DNAm em células endoteliais

A incubação de células endoteliais com DNAm, tanto de animais controle [URL/ug prot., DNAmc = 1676 ± 176,9 *vs.* veículo = 712,0 ± 97,1; P<0,05], quanto de animais diabéticos [URL/ug prot., DNAmd = 2184 ± 573 *vs.* veículo = 712,0 ± 97,1; P<0,05] aumentou a geração de EROs, avaliada pela luminescência para lucigenina (figura 30).

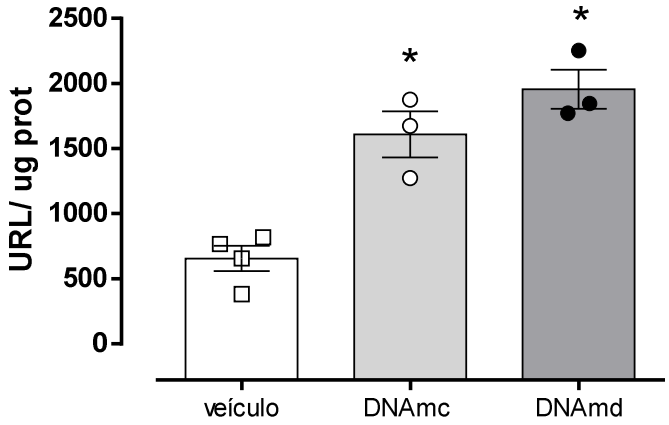


Figura 30 Luminescência para lucigenina em células endoteliais (Eahy926) incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente). Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* veículo, N=3-4.

Também avaliamos se o influxo de cálcio aumentaria em resposta ao DNAm.

5.23. Avaliação do efeito do DNAm sobre o influxo de Ca^{2+} em células endoteliais

Tanto o DNAmc [URF, DNAmc = 223,3 ± 14,7 *vs.* veículo = 130,0 ± 8,6; P<0,05] como o DNAmd [URF, DNAmd = 315,0 ± 19,0 *vs.* veículo = 130,0 ± 8,6; P<0,05] aumentaram o influxo de Ca^{2+} em células endoteliais. Entretanto, o efeito foi significativamente maior em células expostas ao DNAmd [URF, DNAmd = 315,0 ± 19,0 *vs.* DNAmc = 223,3 ± 14,7; P<0,05] (figura 31).

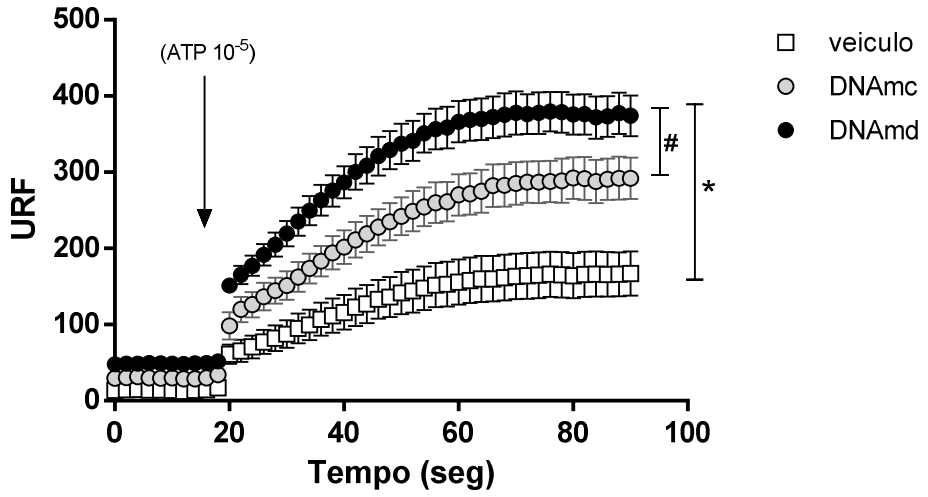


Figura 31 Fluorescência para o influxo de Ca^{2+} em células endoteliais (Eahy926) incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente) e estimuladas com ATP (10^{-5} M). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* Veículo; #, P<0,05 *vs.* DNAmd, N=7-10.

Como observamos que o DNAm produziu efeitos semelhantes em CMLV e células endoteliais, decidimos testar se a incubação de artérias mesentéricas com DNAm induz disfunção endotelial.

5.24. Avaliação do efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio

A incubação com DNAmd, mas não com DNAmc, reduziu a resposta de relaxamento dependente do endotélio [Rmáx, DNAmd = 57,3 ± 3,7 *vs.* veículo = 90,5 ± 3,4; P<0,05] (figura 32).

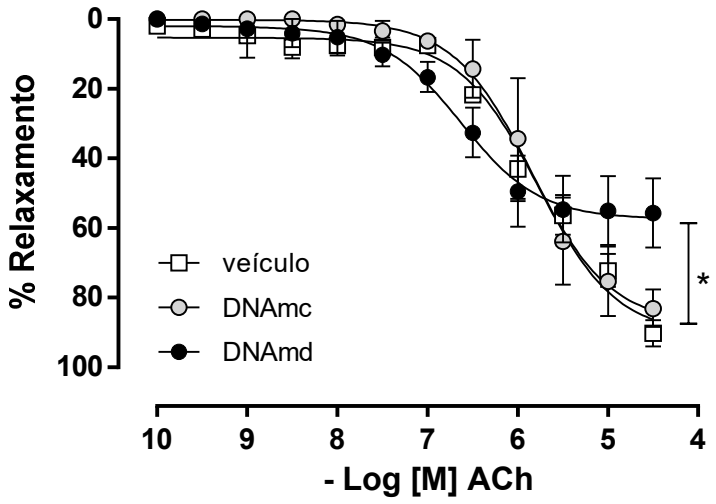


Figura 32 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* veículo, N=5.

Tabela 8 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais controles e diabéticos (DNAmc e DNAmd, respectivamente).

	Veículo		**DNAmc**		**DNAmd**	
	Rmáx	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**
ACh	90,5 ± 3,4	5,8 ± 0,1	87,3 ± 5,9	5,8 ± 0,1	57,3 ± 0,1*	6,6 ± 0,1*
	(5)		(5)		(5)	

Os valores de Rmáx (Resposta máxima) representam a média ± E.P.M.
pD_2– logaritmo negativo da EC_{50} (concentração que promove 50% da Rmáx)
O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.
*, P<0,05 *vs.* veículo

Em nosso próximo passo avaliamos a participação das EROs na redução da resposta de relaxamento, visto que o DNAm aumenta a geração de EROs em CMLV e células endoteliais.

5.25. Avaliação da participação de EROs nos efeitos do DNAmd sobre a redução da resposta de relaxamento dependente do endotélio

Tanto a incubação com Tiron [Rmáx, DNAmd+Tiron = 74,0 ± 3,4 *vs.* Veículo+Tiron = 70,1 ± 1,8; P<0,05] (figura 33A) quanto com CCCP [Rmáx, DNAmd+CCCP = 77,7 ± 3,3 *vs.* Veículo+CCCP = 66,8 ± 5,7; P<0,05] (figura 33B) reverteram a redução de relaxamento em artérias mesentéricas induzida pelo DNAmd.

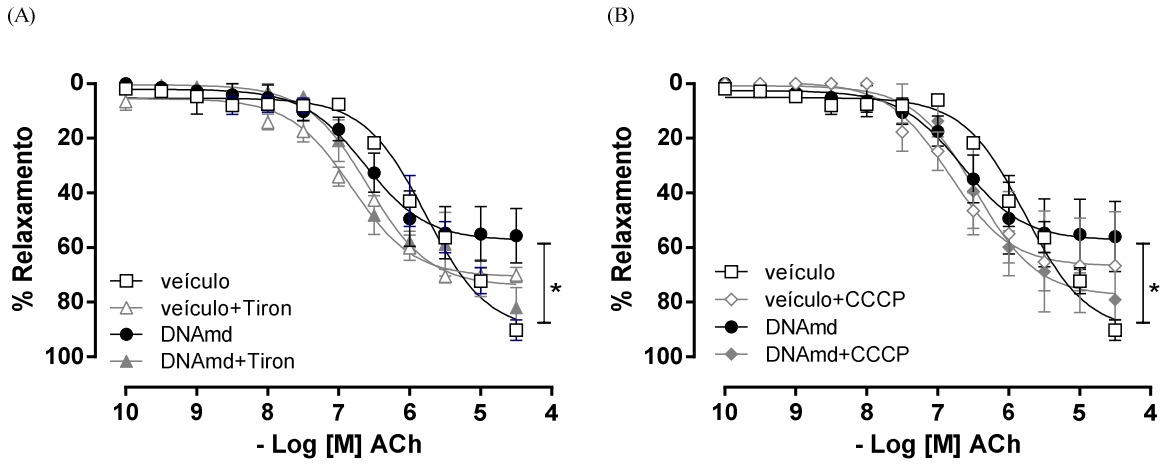


Figura 33 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais diabéticos (DNAmd) antes e após a incubação com (A) Tiron (10^{-4} M) e (B) CCCP (10^{-6} M). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* veículo, N=4-5.

Tabela 9 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais diabéticos (DNAmd) antes e após a incubação com veículo ou Tiron e CCCP.

	Veículo		**DNAmd**		**Veículo+ Tiron**		**DNAmd+ Tiron**		**Veículo+ CCCP**		**DNAmd+ CCCP**	
	Rmáx	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**
ACh	90,5 ± 3,4	5,8 ± 0,1	57,3 ± 3,8*	6,6 ± 0,2*	70,1± 1,8	6,8 ± 0,1	74,0 ± 3,4	6,6 ± 0,1	66,8 ± 5,7	6,8 ± 0,2	77,7 ± 3,3	6,5 ± 0,1
	(5)		(5)		(4)		(5)		(4)		(5)	

Os valores de Rmáx (Resposta máxima) representam a média ± E.P.M.
pD_2– logaritmo negativo da EC_{50} (concentração que promove 50% da Rmáx)
O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.
*, P<0,05 *vs.* veículo

Nos perguntamos, ainda, se a incubação aguda com o inibidor do NLRP3, MCC950, preveniria a redução na resposta de relaxamento induzida pelo DNAmd.

5.26. Avaliação da participação do NLRP3 nos efeitos do DNAmd sobre a redução da resposta de relaxamento dependente do endotélio

MCC950 preveniu a redução do relaxamento em artérias mesentéricas induzida por DNAmd [Rmáx, DNAmd+MCC950 = 89,5 ± 5,4 *vs.* Veículo+MCC950 = 89,0 ± 4,1; P<0,05] (figura 34).

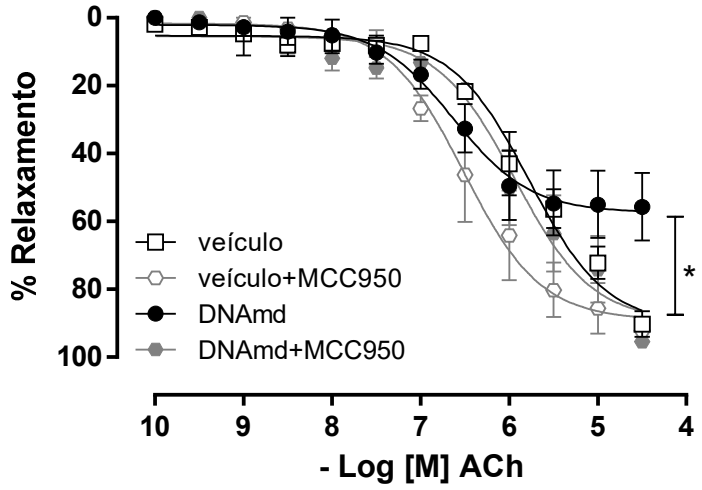


Figura 34 Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais diabéticos (DNAmd) na presença de veículo e MCC950 (10^{-6} M). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* veículo, N=4-5.

Tabela 10 Resposta Máxima e sensibilidade a ACh em artérias mesentéricas isoladas de camundongos C57Bl/6 incubadas com veículo e DNA mitocondrial (1 µg/ml) de animais diabéticos (DNAmd) antes e após a incubação com veículo ou MCC950.

	Veículo		**DNAmd**		**Veículo+ MCC950**		**DNAmd+ MCC950**	
	Rmáx	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**	**Rmáx**	**pD_2**
ACh	90,5 ± 3,4	5,8 ± 0,1	57,3 ± 3,8*	6,6 ± 0,2*	89,0± 4,1	6,5 ± 0,1	89,5 ± 5,4	5,9 ± 0,1
		(5)		(5)		(4)		(5)

Os valores de Rmáx (Resposta máxima) representam a média ± E.P.M.
pD_2– logaritmo negativo da EC_{50} (concentração que promove 50% da Rmáx)
O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.
*, P<0,05 *vs.* veículo

Depois de avaliar diferentes mecanismos celulares que contribuiriam para os efeitos vasculares do DNAm, em nosso próximo protocolo avaliamos porque, na maior parte dos

resultados, apenas o DNAm de animais diabéticos induz tais alterações. Considerando que o DNAm oxidado promove ativação do inflamassoma NLRP3, como demonstrado por Shimada *et. al* (2012), avaliamos a oxidação do DNA isolado do soro e, ainda, do DNAm extraído do pâncreas, realizando medida dos níveis de 8-OHdG.

5.27. Avaliação da oxidação do DNAm circulante e pancreático

A oxidação do DNA, avaliada pelos níveis de 8-OHdG, tanto do DNA extraído do soro quanto do DNAm extraído do pâncreas, não foi alterada pelo diabetes (figura 35A e 35B).

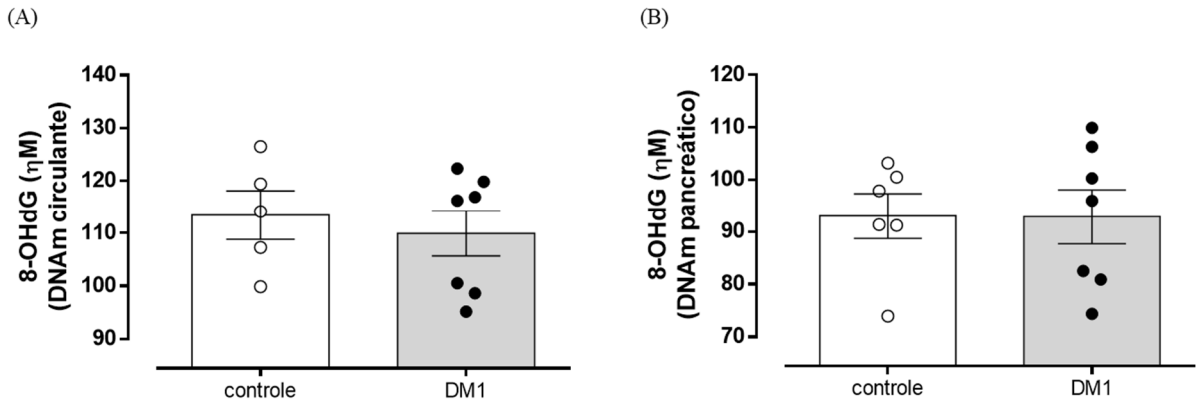


Figura 35 Níveis de 8-OHdG no DNA circulante, extraído do soro, e no DNAm extraído do pâncreas de camundongos C57Bl/6 tratados com veículo (controle) ou estreptozotocina (DM1). Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* veículo, N=5-7.

Por fim, avaliamos se duas das respostas observadas em nosso trabalho, o aumento na expressão de componentes do inflamassoma NLRP3 e o aumento da liberação de DNAm circulante, poderiam ser observadas clinicamente, ou seja, em pacientes diabéticos do tipo 1.

5.28. Avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 no soro de pacientes diabéticos tipo 1

O diabetes aumentou a expressão de NLRP3 [U.A., DM1 = 0,18 ± 0,1 *vs.* Não-diabético = 0,13 ± 0,1; P<0,05] (figura 36A), bem como a ativação de caspase-1 [U.A., DM1 = 2,0 ± 0,1 *vs.* Não-diabético = 1,6 ± 0,1; P<0,05] (figura 36B) e de IL-1β [U.A., DM1 = 1,3 ± 0,1 *vs.* Não-diabético = 0,9 ± 0,1; P< 0,05] (figura 36C) no soro dos pacientes.

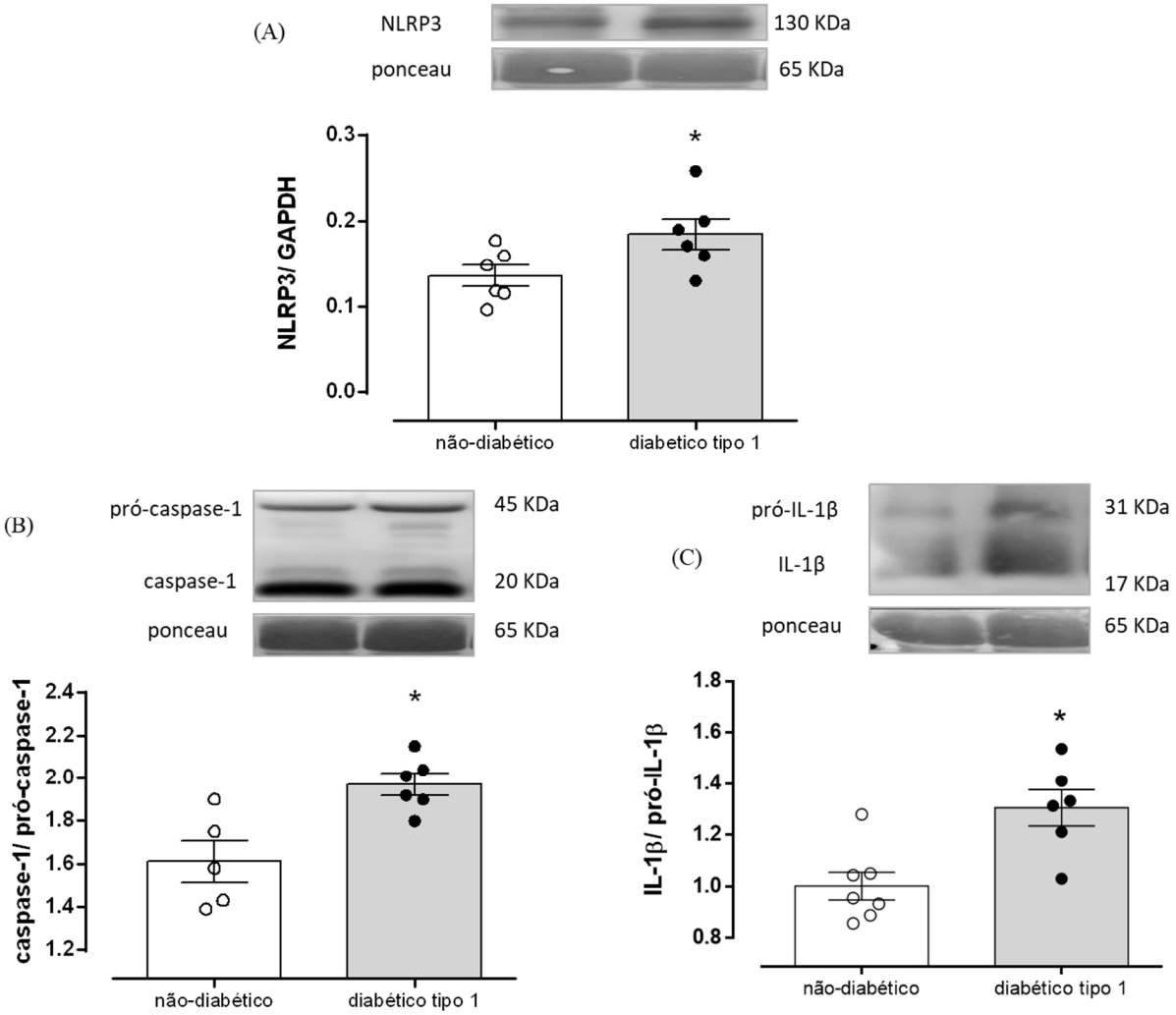


Figura 36 Expressão de (A) NLRP3, e formas pró e clivada de (B) caspase-1 (C) IL-1β. Na parte superior, imagens representativas de western blot e, na parte inferior, análise densitométrica correspondente à razão da expressão de NLRP3/Ponceau, caspase-1/pró-caspase-1 e IL-1β/pró-IL-1β. A membrana corada com Ponceau foi utilizada como normalizador. As proteínas foram isoladas do soro de indivíduos não-diabéticos e diabéticos do tipo 1. Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* não-diabético, N=5-6.

5.29. Avaliação do DNA mitocondrial circulante em pacientes diabéticos do tipo 1

O diabetes promoveu aumento na liberação do DNAm circulante em pacientes diabéticos do tipo 1 (figura 37).

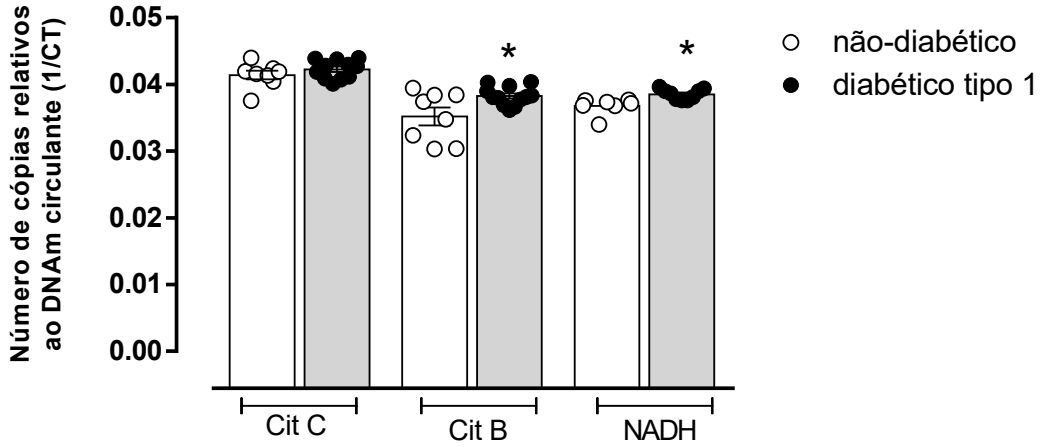


Figura 37 Quantificação dos genes do DNA mitocondrial, NADH desidrogenase (NADH), citocromo B (Cit B) e citocromo C (Cit C) no soro de indivíduos não-diabéticos e diabéticos do tipo 1. Determinação realizada por RT-PCR. Cada barra representa a média ± E.P.M. *, P<0,05 *vs.* não-diabético, N=8-12.

6.DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O inflamassoma NLRP3 tem sido associado não somente à ativação de células do sistema imune e resposta inflamatória, como também à ativação de células vasculares e alterações na função vascular.

No presente trabalho, nós observamos que animais deficientes de NLRP3 foram protegidos da disfunção endotelial ocasionada pelo DM1. Outros estudos também demonstram a relação entre o inflamassoma NLRP3 e a disfunção endotelial.

A ativação vascular de caspase-1 e IL-1β acompanhada de prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio demonstrada por nós, também foi demonstrada por Chen *et al.* (2015) em camundongos tratados com fragmentos da parede celular de *Lactobacillus casei,* um modelo animal de doença inflamatória, a doença de Kawasaki. Os animais deste estudo apresentam redução da vasodilatação dependente do endotélio acompanhada de aumento na expressão de VCAM-1 e da atividade de caspase-1 e IL-1β. O silenciamento do gene do NLRP3, *in vitro*, previne a ativação de caspase-1 e IL-1β em células endoteliais (Chen *et al.*, 2015).

De forma semelhante ao estudo acima, porém utilizando um modelo animal de obesidade, Liu et al. (2015) observaram prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio em aortas de ratos Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLEF) com 3 e 12 meses de idade, acompanhada de aumento na expressão vascular de NLRP3 e caspase-1 e IL-1β (Liu, P. *et al.*, 2015).

Assim como em nosso estudo, a ausência do receptor NLRP3 também protege a função vascular de artérias coronárias de camundongos hipercolesterêmicos quando comparada a artérias de camundongos com o receptor NLRP3, como demonstrado por Zhang et al. (2015). Os autores associaram a proteção da função endotelial à redução vascular da geração de ânion superóxido e ao aumento da atividade da eNOS (Zhang *et al.*, 2015).

Um dos principais mecanismos associados à disfunção endotelial é a geração de EROs. A família de enzimas NADPH oxidases, ou Nox, é uma das principais fontes de geração de EROs em diferentes órgãos, inclusive na vasculatura (Hansen *et al.*, 2018).

Neste trabalho nós observamos que artérias mesentéricas de animais deficientes de NLRP3 tem menor expressão de Nox4, um possível mecanismo para explicar a redução na geração de EROs em animais diabéticos deficientes de NLRP3.

A relação entre Nox4 e ativação do inflamassoma NLRP3 também foi demonstrada por Wang et al. (2017). Os autores observaram que quando a Nox4 é inibida há redução na geração de EROs, bem como redução da expressão proteica de NLRP3, caspase-1 e IL-1β em células endoteliais estimuladas com alta concentração de glicose (Wang *et al.*, 2017).

De maneira semelhante ao nosso trabalho, Chen et al. (2018) demonstraram que a menor ativação do inflamassoma NLRP3, associada à menor expressão de Nox4, promove redução na geração de EROs. Os autores relataram em seu estudo que cardioblastos provenientes de ratos estimulados com TNF-α e submetidos a hipóxia, quando pré-tratados com liraglutida, um análogo do peptídeo semelhante a glucagon 1, tem menor ativação do inflamassoma NLRP3, menor expressão de Nox4 e, consequentemente, menor geração de EROs (Chen *et al.*, 2018).

A relação entre IL-1β, Nox4 e EROs também foi demonstrada por Ginnan et al. (2013). Os autores observaram que CMLV provenientes de aorta de ratos estimuladas com IL-1β apresentam aumento na geração de EROs, o que não é observado em CMLV onde o gene da Nox4 é silenciado (Ginnan *et al.*, 2013).

O inflamassoma NLRP3 parece estar envolvido na regulação da expressão das Nox. Dolunay et al. (2017) demonstraram redução da expressão das subunidades da Nox2, $gp91^{phox}$ e $p47^{phox}$, no cérebro, coração e pulmão de camundongos com hiperalgesia induzida por LPS após tratamento por 6 horas com MCC950, inibidor do NLRP3 (Dolunay *et al.*, 2017).

Além de modular a expressão de Nox, a inibição do inflamassoma NLRP3 também modula a expressão de moléculas de adesão. No presente trabalho observamos que o leito mesentérico de animais deficientes de NLRP3 apresenta redução da expressão gênica de VCAM-1 e ICAM-1.

Bruder-Nascimento et al. (2016) também relataram redução da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 em artérias mesentéricas de camundongos deficientes para caspase-1, IL-1R e NLRP3. A menor expressão de moléculas de adesão ainda é observada quando estes animais são infundidos com aldosterona, demonstrando que a deficiência de NLRP3 (ou de componentes do inflamassoma) também protege contra os danos inflamatórios causados por este hormônio na vasculatura (Bruder-Nascimento *et al.*, 2016).

Semelhantemente, van der Heijden et al. (2017) observaram redução da expressão gênica de VCAM-1 e ICAM-1 em carótidas com placa aterosclerótica após o tratamento com MCC950 por 4 semanas em camundongos deficientes em apolipoproteína E e submetidos a colocação de colar semiconstritivo perivascular e a dieta tipo Western. A redução destes marcadores

inflamatórios (ou da expressão de moléculas de adesão) é acompanhada pela menor infiltração de macrófagos e pelo menor número de lesões ateroscleróticas (Van Der Heijden *et al.*, 2017).

A resposta à insulina é outro evento influenciado pelo inflamassoma NLRP3 e pela IL-1β. Nossos resultados demonstram que animais deficientes de NLRP3 tem aumento na sensibilidade ao relaxamento induzido pela insulina e, ainda, não apresentam redução da vasodilatação induzida por insulina causada pelo diabetes.

A sinalização da insulina no endotélio vascular ocorre pela ativação de uma sequência de eventos de fosforilação iniciada pela fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1, *Insulin receptor substrate 1*), seguida por fosforilação e ativação de PI3K e Akt e, finalmente, pela fosforilação do resíduo Ser^{1177} da eNOS, resultando em aumento da produção de NO, o que promove vasodilatação (Zeng e Quon, 1996; Zeng *et al.*, 2000; Montagnani *et al.*, 2001; Montagnani *et al.*, 2002).

A redução desta sinalização e/ou fosforilação destas proteínas pode ser influenciada pela ativação do inflamassoma NLRP3 e consequente aumento de IL-1β, como demonstrado por Sun et al. (2017). Esses autores observaram ativação do inflamassoma NLRP3 com superexpressão do receptor e superprodução de caspase-1 e IL-1β em células de hepatoma de linhagem humana estimuladas com ácido palmítico e LPS, conhecidos por induzir resistência à insulina, acompanhada de redução da fosforilação de IRS-1, PI3K e Akt. Os autores demonstraram também que a deleção do gene do NLRP3 e da IL-1β reverte parcialmente o prejuízo na sinalização da insulina aumentando a fosforilação destas mesmas proteínas (Sun *et al.*, 2017).

Adipócitos livres das ações do inflamassoma NLRP3 parecem ser metabolicamente mais ativos e sensíveis a ação da insulina. Stienstra et al. (2010) relataram que pré-adipócitos diferenciados de camundongos deficientes de caspase-1 e NLRP3 apresentam maior expressão de adiponectina, Glut4 e PPARγ, fatores relacionados ao metabolismo da glicose, bem como aumento da fosforilação de Akt, quando comparados a pré-apócitos provenientes de camundongos WT que apresentam os genes da caspase-1 e NLRP3 (Stienstra *et al.*, 2010).

Goossens et al. (2012) também demonstraram relação entre resistência à insulina e o inflamassoma NLRP3. Os autores relataram aumento na expressão gênica de caspase-1 em adipócitos de indivíduos com resistência à insulina e, ainda, aumento de diferenciação de células Th1, envolvidas com a secreção de TNF-α, fator associado a resistência à insulina e inflamação (Goossens *et al.*, 2012).

A atenuação dos efeitos da IL-1β é efetiva para melhorar o quadro de resistência à insulina. Um ensaio clínico realizado por Laersen et al. (2007) demonstrou que pacientes com DM2 tratados por 13 semanas com anakinra, antagonista recombinante do receptor de interleucina-1 humano, apresentam redução dos níveis glicêmicos e diminuição da resistência à insulina avaliada pela função da célula β pela razão pro-insulina/ insulina (Larsen *et al.*, 2007).

Tanto a resistência à insulina como a disfunção endotelial são mecanismos afetados pela geração de EROs e a IL-1β tem papel importante na sua geração.

Kaur et al. (2004) demonstraram que a incubação com doses crescentes de IL-1β por 24 horas aumenta a geração de EROs pelo aumento da atividade da NADPH oxidase em CMLV provenientes de artérias coronárias humanas (Kaur *et al.*, 2004). De maneira semelhante, Toniolo et al. (2015) demonstraram que doses crescentes de IL-1β, por 30 minutos, induzem geração de EROs em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) (Toniolo *et al.*, 2015).

A inibição das ações da IL-1β também é eficiente para proteção da função endotelial. Vallejo et al. (2014) relataram que o tratamento com anakinra previne o aumento na geração de EROs em artérias mesentéricas de ratos diabéticos e, ainda, previne a redução da vasodilatação dependente do endotélio, induzida por doses crescentes de IL-1β (Vallejo *et al.*, 2014b).

Não só a IL-1β induz geração de EROs, como as EROs também induzem a produção de IL-1β. Wang et al. (2012) relataram que astrócitos em cultura, provenientes de camundongos BALB/C, estimulados com altas concentrações de glicose tem aumento na expressão gênica de IL-1β, bem como de TNF-α, IL-6 e IL-4, o que é bloqueado/prevenido na presença de um varredor de EROs (Wang *et al.*, 2012).

Além das Nox, outras fontes produzem EROs como, por exemplo, as mitocôndrias, consideradas a principal fonte endógena de radicais superóxido, peroxinitrito e radicais hidroxila (Young *et al.*, 2002). O diabetes causa danos às mitocôndrias alterando seu potencial de membrana, elevando os níveis de superóxido e prejudicando a taxa de respiração e a maquinaria de transporte de elétrons na membrana, bem como a biogênese e o número de cópias mitocondriais (Kowluru, 2005; Kanwar *et al.*, 2007; Zhong e Kowluru, 2010).

As EROs mitocondriais também são importante fonte de ativação do inflamassoma NLRP3. Zhou et al. (2011) demonstraram que macrófagos humanos apresentam aumento da liberação de IL-1β induzida pela geração de EROs mitocondrial estimulada por doses crescentes de bloqueadores de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. A deleção dos genes

do NLRP3 e de caspase-1 tanto em macrófagos humanos, quanto em macrófagos provenientes de camundongos, inibe o aumento de IL-1β decorrente da geração de EROs mitocondrial (Zhou *et al.*, 2011).

Além das EROs mitocondriais, outros fatores estão envolvidos com a ativação do inflamassoma NLRP3 como, por exemplo, os DAMPs, sendo o DNA mitocondrial o DAMP avaliado em nosso trabalho.

O papel imunoestimulador do DNA mitocondrial foi primeiramente relatado por Collins et al. (2004). Neste estudo, os autores demonstraram que a administração intra-articular de DNA mitocondrial extraído de mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos humanos e murinos, como o fígado, induz artrite inflamatória em camundongos, evento associado ao aumento dos níveis de TNF-α (Collins *et al.*, 2004).

Além do aumento de TNF-α, Zhang et al. (2010) também observaram aumento de IL-6 e da migração de neutrófilos, causando injúria tecidual, três horas após infusão de DNA mitocondrial em camundongos (Zhang *et al.*, 2010)

Nossos achados, demonstrando o papel imunoestimulador do DNA mitocondrial, corroboram com estes estudos visto que a incubação com DNA mitocondrial extraído do pâncreas de camundongos diabéticos estimula a produção de fatores pró-inflamatórios em CMLV e células endoteliais.

A literatura demonstra que a ativação da resposta inflamatória via DNA mitocondrial está associada a suas ações através da ligação com o receptor TLR-9. No estudo de Zhang et al. (2009), neutrófilos humanos estimulados com DNA mitocondrial extraído de diversos tecidos apresentaram aumento da fosforilação de MAPKs, como a p38 e a p44/42, e dos níveis de IL-8, sendo este efeito inibido na presença de um antagonista de TLR-9 (Zhang *et al.*, 2010).

Pazmandi et al. (2014) também relataram relação entre DNA mitocondrial e TLR-9. Nesse estudo, células dendríticas plasmocitóides estimuladas com DNA mitocondrial extraído de linhagens celulares mielóides humana e murina apresentaram aumento de IL-8 e TNF-α, efeitos prevenidos pela inibição de TLR-9 (Pazmandi *et al.*, 2014).

Entretanto, as ações do DNA mitocondrial podem acontecer pela ativação de outros receptores como, por exemplo, o NLRP3, como observado no presente trabalho.

No estudo de Nakahira et al. (2011), macrófagos primados com LPS e incubados com DNA mitocondrial extraído de macrófagos peritoneais quando estimulados com ATP

apresentaram aumento na ativação de caspase-1 e liberação de IL-1β, ativação que está associada à via do inflamassoma NLRP3. Neste estudo os autores também mostraram que a liberação de DNA mitocondrial para o citosol celular, medida pelo número de cópias relativas ao DNA mitocondrial, é dependente da ativação do inflamassoma NLRP3, visto que animais deficientes de NLRP3 tem este efeito reduzido. Os autores ainda observaram que quando o DNA mitocondrial é depletado a liberação de IL-1β é atenuada, ou seja, que o DNA mitocondrial ativa o inflamassoma NLRP3 e que a ativação do inflamassoma NLRP3 é importante para liberar o DNA mitocondrial para o citosol celular, sugerindo a existência de eventos cíclicos, onde a ativação de um gera a liberação de outro, que, por consequência, torna a ativar o primeiro (Nakahira *et al.*, 2011).

Em nosso trabalho nós também associamos as ações do DNA mitocondrial à ativação do receptor NLRP3, pois quando incubamos as CMLV com o antagonista de TLR-9 a ativação de caspase-1 não é prevenida e, ainda, quando utilizamos CMLV provenientes de camundongos deficientes de NLRP3, a ativação de caspase-1 induzida pelo DNA mitocondrial (como ocorre em CMLV provenientes de camundongos que apresentam o receptor NLRP3) não é observada.

De maneira semelhante, Shimada et al. (2012) demonstraram ativação do inflamassoma NLRP3 e consequente aumento de caspase-1 e IL-1β induzidos pelo DNA mitocondrial liberado no citosol celular de macrófagos murinos primados com LPS e estimulados com ATP. Os autores relataram ainda que o DNA mitocondrial que se liga diretamente ao receptor NLRP3 é um DNA oxidado (Shimada *et al.*, 2012).

A oxidação do DNA mitocondrial é um fator que tem sido associado a maior imunogênese, como verificado por Pazmandi et al. (2014), onde o aumento de fatores pró-inflamatórios (IL-8 e TNF-α) induzidos pelo DNA mitocondrial, já discutido previamente, é potencializado quando o DNA mitocondrial está oxidado.

Uma das modificações mais comuns relacionadas à oxidação do DNA está nos níveis de bases de guanina modificadas oxidativamente (8-OHdG) (Kuchino *et al.*, 1987) e, no diabetes, esta modificação já foi encontrada na urina, em células mononucleares e no músculo esquelético de pacientes (Dandona *et al.*, 1996; Leinonen *et al.*, 1997; Hinokio *et al.*, 1999).

Nossos resultados não demonstram maiores níveis de oxidação, avaliada pelos níveis de 8-OHdG, no DNA mitocondrial circulante e pancreático de animais com diabetes. Entretanto, outras modificações podem estar ocorrendo no sentido de aumentar a imunogênese do DNA mitocondrial como, por exemplo, alterações epigenéticas.

Dentre as modificações epigenéticas, há correlação entre o processo de metilação do DNA e o diabetes, como demonstrado por Mishra et al. (2015). Nesse estudo os autores observaram que altas concentrações de glicose aumentam a metilação do DNA mitocondrial em células endoteliais da retina, além de observar aumento na metilação do DNA mitocondrial na microvasculatura retiniana de doadores humanos com retinopatia diabética (Mishra e Kowluru, 2015).

No diabetes o processo de metilação do DNA em vários órgãos está associado às complicações micro e macrovasculares (Kato e Natarajan, 2014) o que demonstra a importância de avaliarmos este processo. A metilação do DNA mitocondrial poderia ser o mecanismo para explicar a maior imunogênese associada ao DNA mitocondrial de animais diabéticos em nosso trabalho, sendo alvo de futura investigação.

A geração de EROs mitocondrial representa outro potencial mecanismo para ativação do inflamassoma NLRP3 e, consequentemente, para ativação de caspase-1 e IL-1β, pelo DNA mitocondrial, como demonstrado por Zhou et al. (2011). Portanto, a geração de EROs também foi alvo de nossa investigação.

Em nosso trabalho constatamos que o aumento de EROs ativado pelo DNA mitocondrial de animais diabéticos é gerado pela mitocondria, visto que quando as CMLV foram incubadas com um agente antioxidante mitocondrial, o CCCP, este aumento foi prevenido. Nakahira et al. (2011) também observaram que a incubação com um agente atioxidante mitocondrial, o MitoTEMPO, previne a geração de EROs e a consequente liberação de IL-1β ativada pelo DNA mitocondrial em macrófagos murinos, o que reforça a relação entre DNA mitocondrial, EROs mitocondrial e ativação do inflamassoma NLRP3 (Nakahira *et al.*, 2011).

Dessa forma, concluímos que a geração de EROs pela mitocôndria, ativada pelo DNA mitocondrial de animais diabéticos no presente trabalho, é responsável por ativar o inflamassoma NLRP3 em CMLV e endoteliais.

Além das EROs mitocondriais, outro mecanismo tem sido associado à ativação do inflamassoma NLRP3, o influxo de Ca^{2+}. O estudo de Murakami et al. (2012) demonstrou que o influxo Ca^{2+} é fundamental para a ativação do NLRP3 e consequente liberação de IL-1β em macrófagos primados com LPS e estimulados com ATP, já que este efeito é prevenido na presença de bloqueador da mobilização de Ca^{2+}, a tapsigargina (Murakami *et al.*, 2012).

Nakahira et al. (2011), em estudo já mencionado nesta discussão, demonstraram que o aumento do influxo de Ca^{2+} é induzido pela incubação com DNA mitocondrial em macrófagos

primados com LPS e estimulados com ATP (Nakahira *et al.*, 2011). No presente trabalho nós observamos este efeito de aumento do influxo de $Ca^{2+,}$ tanto em CMLV quanto em células endoteliais incubadas com DNA mitocondrial, o que consideramos outro potencial mecanismo associado à ativação do inflamassoma NLRP3.

No entanto, se o aumento na geração de EROs pela mitocôndria e o aumento do influxo de Ca^{2+} induzidos pelo DNA mitocondrial de animais diabéticos são eventos que acontecem de forma independente, ou se o aumento do influxo de Ca^{2+} ativa a geração de EROs pela mitocôndria, será alvo de futura investigação, pois sabe-se que a sobrecarga de Ca^{2+} na mitocondria está associada a aumento na geração de EROs mitocondrial por alterar a disposição e oxidação de fosfolipídeos mitocondriais como, por exemplo, a cardiolipina (Paradies *et al.*, 2009).

A oxidação da cardiolipina induzida pelo aumento da sobrecarga de Ca^{2+} está associada a apoptose celular, visto que este efeito causa formação de poros de transição de permeabilidade mitocondrial, interrompendo a interação da cardiolipina com o Cit C para promover sua liberação na mitocôndria, o que induz apoptose (Wiswedel *et al.*, 2010). Em nosso estudo observamos aumento na expressão de Cit C em artérias mesentéricas de animais diabéticos, além de aumento da expressão de Bax, outra proteína envolvida com a sinalização de apoptose celular, o que sugere que estas artérias provavelmente estão submetidas a um processo de disfunção mitocondrial e apoptose, os quais poderiam ser desencadeados pela ativação do DNA mitocondrial circulante.

O estudo de Shimada et al. (2012), já discutido neste trabalho, mostrou que a ativação do inflamassoma NLRP3 induzida por DNA mitocondrial em macrófagos murinos aumenta a apoptose celular por um processo de disfunção mitocondrial, o que reforça a interação entre DNA mitocondrial, NLRP3 e apoptose.

A liberação de DNA mitocondrial para o sangue, ou seja, presença de DNA mitocondrial circulante ocorre em diversas condições. Qin et al. (2017) observaram que pacientes pós-infarto do miocárdio apresentam aumento nos níveis de DNA mitocondrial circulante em comparação com indivíduos saudáveis, sendo este aumento acompanhado por maiores níveis de citocinas inflamatórias como TNF-α e IL-6 (Qin *et al.*, 2017).

Malik et al. (2015) demonstraram que pacientes diabéticos com retinopatia apresentam aumento do DNA mitocondrial circulante e aumento de citocinas inflamatórias como IL-4 e TNF-α (Malik *et al.*, 2015). Liu et al. (2016) encontraram maiores níveis de DNA mitocondrial

circulante em pacientes com doença arterial coronária em comparação a indivíduos saudáveis, sendo este aumento potencializado em indivíduos com diabetes (Liu *et al.*, 2016).

Pacientes com câncer de mama (Mahmoud *et al.*, 2015) e câncer gástrico (Fernandes *et al.*, 2014) também apresentam níveis elevados de DNA mitocondrial circulante quando comparados a indivíduos saudáveis. Nestes estudos os autores sugeriram que este parâmetro pode ser utilizado como biomarcador dos estágios iniciais da doença.

Estes resultados corroboram com nosso trabalho, onde pacientes DM1 apresentam aumento do DNA mitocondrial circulante, determinado pelo número de cópias relativo ao DNA mitocondrial.

Acreditamos que nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a relação entre DNA mitocondrial, ativação vascular do inflamassoma NLRP3 e disfunção endotelial no diabetes.

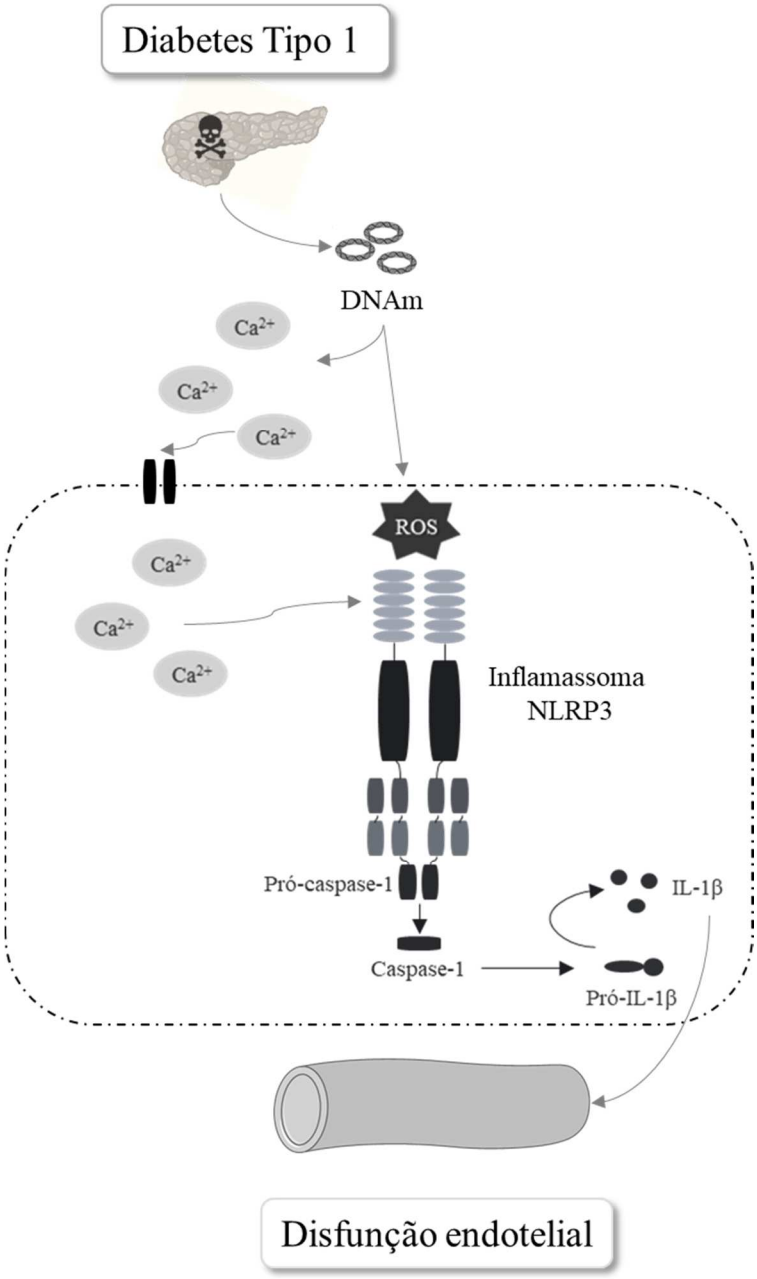
Existem pontos que poderiam ser abordados e experimentos adicionais que reforçariam a relação direta entre o aumento do influxo de Ca^{2+}, aumento de EROs e ativação do inflamassoma NLRP3, os quais não foram ainda completamente abordados. Neste sentido, a estimulação de CMLV e células endoteliais com DNA mitocondrial na presença de quelante de Ca^{2+} seria importante para avaliarmos se a ativação do inflamassoma NLRP3 é abolida e/ou atenuada. A relação entre o influxo de Ca^{2+} e a geração de EROs, de maneira a entender a interdependência dos efeitos, também seria outro ponto importante para avaliarmos. Por exemplo, a incubação de CMLV e células endoteliais com DNA mitocondrial na presença de quelante de Ca^{2+} permitiria observar se a geração de EROs é prevenida e/ou atenuada. A geração de EROs mitocondriais induzida por DNA mitocondrial em células endoteliais também poderia ser avaliada. Além disso, os efeitos da deleção de NLRP3 sobre a sinalização da insulina, avaliando a expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização como PI3K e Akt, e a ativação de receptores como o IRS-1, também representam mecanismos importantes que poderiam explicar a proteção ao dano vascular associado ao diabetes em animais deficientes para NLRP3, os quais futuramente pretendemos avaliar. A incubação com DNA mitocondrial extraído do pâncreas de animais diabéticos deficientes para NLRP3 também seria um resultado interessante para avaliarmos se a deficiência do gene interfere no grau de imunogênese do DNA mitocondrial. Muitas perguntas ainda necessitam de respostas, sendo algumas alvo de nossos próximos experimentos no sentido de tornar nosso trabalho mais elegante e completo.

7.CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados neste trabalho é possível concluir que o DNA mitocondrial pancreático de animais diabéticos promove ativação do inflamassoma NLRP3 em CMLV e células endoteliais através do aumento no influxo de Ca^{2+} e da geração de EROs, contribuindo para o processo de disfunção endotelial e, ainda, que a deficiência de NLRP3 protege os animais diabéticos contra os danos vasculares inflamatórios e disfunção endotelial observados no diabetes.

Figura 38 Representação esquemática da conclusão do trabalho



8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, L. et al. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. **Immunity,** v. 20, n. 3, p. 319-25, Mar 2004. ISSN 1074-7613 (Print)
1074-7613 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15030775 >.

ALVES-LOPES, R. et al. Internal Pudental Artery Dysfunction in Diabetes Mellitus Is Mediated by NOX1-Derived ROS-, Nrf2-, and Rho Kinase-Dependent Mechanisms. **Hypertension,** v. 68, n. 4, p. 1056-64, Oct 2016. ISSN 1524-4563 (Electronic)
0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27528061 >.

AUTORES, V. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. 2018.

BECKMAN, J. A. et al. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in Type 1 but not Type 2 diabetes mellitus. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology,** v. 285, n. 6, p. H2392-8, Dec 2003a. ISSN 0363-6135 (Print)
0363-6135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12881209 >.

_____. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in Type 1 but not Type 2 diabetes mellitus. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 285, n. 6, p. H2392-8, Dec 2003b. ISSN 0363-6135 (Print)
0363-6135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12881209 >.

BENSI, G. et al. Human interleukin-1 beta gene. **Gene,** v. 52, n. 1, p. 95-101, 1987. ISSN 0378-1119 (Print)
0378-1119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2954882 >.

BERTONI, A. G. et al. Diabetes-related morbidity and mortality in a national sample of U.S. elders. **Diabetes Care,** v. 25, n. 3, p. 471-5, Mar 2002. ISSN 0149-5992 (Print)
0149-5992 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874932 >.

BOLTON, C. H. et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. **Nephrol Dial Transplant,** v. 16, n. 6, p. 1189-97, Jun 2001. ISSN 0931-0509 (Print)
0931-0509 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390719 >.

BOYDEN, E. D.; DIETRICH, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. **Nature genetics,** v. 38, n. 2, p. 240-4, Feb 2006. ISSN 1061-4036 (Print)
1061-4036 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429160 >.

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 >.

CARLOS, D. et al. Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome and Predisposes to Type 1 Diabetes in Murine Model. **Frontiers in immunology,** v. 8, p. 164, 2017. ISSN 1664-3224 (Print)
1664-3224 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289409 >.

CERSOSIMO, E.; DEFRONZO, R. A. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. **Diabetes Metab Res Rev,** v. 22, n. 6, p. 423-36, Nov-Dec 2006. ISSN 1520-7552 (Print)
1520-7552 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506274 >.

CHAN, S. Y. et al. The prognostic importance of endothelial dysfunction and carotid atheroma burden in patients with coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol,** v. 42, n. 6, p. 1037-43, Sep 17 2003. ISSN 0735-1097 (Print)
0735-1097 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678927 >.

CHEN, A. et al. Liraglutide attenuates NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis via regulating SIRT1/NOX4/ROS pathway in H9c2 cells. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 499, n. 2, p. 267-272, May 5 2018. ISSN 1090-2104 (Electronic)
0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29571736 >.

CHEN, Y. et al. Endothelial Nlrp3 inflammasome activation associated with lysosomal destabilization during coronary arteritis. **Biochimica et biophysica acta,** v. 1853, n. 2, p. 396-408, Feb 2015. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25450976 >.

COLEMAN, H. A.; TARE, M.; PARKINGTON, H. C. Nonlinear effects of potassium channel blockers on endothelium-dependent hyperpolarization. **Acta Physiol (Oxf),** v. 219, n. 1, p. 324-334, Jan 2017. ISSN 1748-1716 (Electronic)
1748-1708 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27639255 >.

COLLINS, L. V. et al. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. **Journal of leukocyte biology,** v. 75, n. 6, p. 995-1000, Jun 2004. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982943 >.

DANDONA, P. et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. **Lancet,** v. 347, n. 8999, p. 444-5, Feb 17 1996. ISSN 0140-6736 (Print)
0140-6736 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8618487 >.

DEFRONZO, R. A. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. **Diabetes,** v. 37, n. 6, p. 667-87, Jun 1988. ISSN 0012-1797 (Print)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3289989 >.

DOLUNAY, A. et al. Inhibition of NLRP3 Inflammasome Prevents LPS-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Mice: Contribution of NF-kappaB, Caspase-1/11, ASC, NOX, and NOS Isoforms. **Inflammation,** v. 40, n. 2, p. 366-386, Apr 2017. ISSN 1573-2576 (Electronic)
0360-3997 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27924425 >.

DUEWELL, P. et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. **Nature,** v. 464, n. 7293, p. 1357-61, Apr 29 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428172 >.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: new therapeutic targets? **Pharmacol Res,** v. 49, n. 6, p. 565-80, Jun 2004. ISSN 1043-6618 (Print)
1043-6618 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15026034 >.

_____. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 26, n. 6, p. 1215-25, Jun 2006. ISSN 1524-4636 (Electronic)
1079-5642 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543495 >.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature,** v. 458, n. 7237, p. 509-13, Mar 26 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158676 >.

FERNANDES, J. et al. Circulating mitochondrial DNA level, a noninvasive biomarker for the early detection of gastric cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology,** v. 23, n. 11, p. 2430-8, Nov 2014. ISSN 1538-7755 (Electronic)
1055-9965 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25159292 >.

FOLLI, F. et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. **Curr Diabetes Rev,** v. 7, n. 5, p. 313-24, Sep 2011. ISSN 1875-6417 (Electronic)
1573-3998 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21838680 >.

FULOP, N.; MARCHASE, R. B.; CHATHAM, J. C. Role of protein O-linked N-acetyl-glucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. **Cardiovasc Res,** v. 73, n. 2, p. 288-97, Jan 15 2007. ISSN 0008-6363 (Print)
0008-6363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16970929 >.

FURCHGOTT, R. F. et al. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. **Blood vessels,** v. 24, n. 3, p. 145-9, 1987. ISSN 0303-6847 (Print)
0303-6847 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3036283 >.

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 >.

GARLAND, C. J.; DORA, K. A. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. **Acta Physiol (Oxf),** v. 219, n. 1, p. 152-161, Jan 2017. ISSN 1748-1716 (Electronic)
1748-1708 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26752699 >.

GEDDES, K.; MAGALHAES, J. G.; GIRARDIN, S. E. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. **Nat Rev Drug Discov,** v. 8, n. 6, p. 465-79, Jun 2009. ISSN 1474-1784 (Electronic)
1474-1776 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19483708 >.

GERALDES, P.; KING, G. L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. **Circ Res,** v. 106, n. 8, p. 1319-31, Apr 30 2010. ISSN 1524-4571 (Electronic)
0009-7330 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431074 >.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res,** v. 107, n. 9, p. 1058-70, Oct 29 2010. ISSN 1524-4571 (Electronic)
0009-7330 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030723 >.

GINNAN, R. et al. NADPH oxidase 4 is required for interleukin-1beta-mediated activation of protein kinase Cdelta and downstream activation of c-jun N-terminal kinase signaling in smooth muscle. **Free radical biology & medicine,** v. 54, p. 125-34, Jan 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic)
0891-5849 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022406 >.

GOOSSENS, G. H. et al. Expression of NLRP3 inflammasome and T cell population markers in adipose tissue are associated with insulin resistance and impaired glucose metabolism in humans. **Molecular immunology,** v. 50, n. 3, p. 142-9, Mar 2012. ISSN 1872-9142 (Electronic)
0161-5890 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22325453 >.

GRENIER, J. M. et al. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. **FEBS letters,** v. 530, n. 1-3, p. 73-8, Oct 23 2002. ISSN 0014-5793 (Print)
0014-5793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12387869 >.

GRISHMAN, E. K.; WHITE, P. C.; SAVANI, R. C. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1beta in the development and progression of type 1 diabetes. **Pediatr Res,** v. 71, n. 6, p. 626-32, Jun 2012. ISSN 1530-0447 (Electronic)
0031-3998 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337228 >.

GUZIK, T. J. et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. **Circulation,** v. 105, n. 14, p. 1656-62, Apr 9 2002. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940543 >.

HANSEN, S. S.; AASUM, E.; HAFSTAD, A. D. The role of NADPH oxidases in diabetic cardiomyopathy. **Biochimica et biophysica acta,** v. 1864, n. 5 Pt B, p. 1908-1913, May 2018. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28754449 >.

HE, W. T. et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. **Cell Res,** v. 25, n. 12, p. 1285-98, Dec 2015. ISSN 1748-7838 (Electronic)
1001-0602 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26611636 >.

HENEKA, M. T. et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. **Nature,** v. 493, n. 7434, p. 674-8, Jan 31 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254930 >.

HINK, U. et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Circ Res,** v. 88, n. 2, p. E14-22, Feb 02 2001. ISSN 1524-4571 (Electronic)
0009-7330 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157681 >.

HINOKIO, Y. et al. Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: its association with diabetic complications. **Diabetologia,** v. 42, n. 8, p. 995-8, Aug 1999. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491760 >.

HOFFMAN, H. M. et al. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. **Nature genetics,** v. 29, n. 3, p. 301-5, Nov 2001. ISSN 1061-4036 (Print)
1061-4036 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687797 >.

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,** v. 112, n. 36, p. 11318-23, Sep 8 2015. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26305961 >.

HUGOT, J. P. et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. **Nature,** v. 379, n. 6568, p. 821-3, Feb 29 1996. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8587604 >.

HUNT, J. V.; DEAN, R. T.; WOLFF, S. P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. **Biochem J,** v. 256, n. 1, p. 205-12, Nov 15 1988. ISSN 0264-6021 (Print)
0264-6021 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2851978 >.

IDF. IDF Diabetes Atlas. **International Diabetes Federation,** v. Eighth edition, 2017. ISSN 978-2-930229-81-2.

IGNARRO, L. J. et al. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics,** v. 244, n. 1, p. 181-9, Jan 1988. ISSN 0022-3565 (Print)
0022-3565 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2826766 >.

JAMES, A. M.; MURPHY, M. P. How mitochondrial damage affects cell function. **J Biomed Sci,** v. 9, n. 6 Pt 1, p. 475-87, 2002. ISSN 1021-7770 (Print)
1021-7770 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372986 >.

JARVISALO, M. J. et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. **Circulation,** v. 109, n. 14, p. 1750-5, Apr 13 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023875 >.

JIANG, B. H. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 97, n. 4, p. 1749-53, Feb 15 2000. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677529 >.

JOURDAN, T. et al. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. **Nature medicine,** v. 19, n. 9, p. 1132-40, Sep 2013. ISSN 1546-170X (Electronic)
1078-8956 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23955712 >.

KAIZER, E. C. et al. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism,** v. 92, n. 9, p. 3705-11, Sep 2007. ISSN 0021-972X (Print)
0021-972X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17595242 >.

KAMINITZ, A. et al. The vicious cycle of apoptotic beta-cell death in type 1 diabetes. **Immunol Cell Biol,** v. 85, n. 8, p. 582-9, Nov-Dec 2007. ISSN 0818-9641 (Print)
0818-9641 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17637698 >.

KANNEGANTI, T. D.; LAMKANFI, M.; NUNEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. **Immunity,** v. 27, n. 4, p. 549-59, Oct 2007. ISSN 1074-7613 (Print)
1074-7613 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967410 >.

KANWAR, M. et al. Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. **Investigative ophthalmology & visual science,** v. 48, n. 8, p. 3805-11, Aug 2007. ISSN 0146-0404 (Print)
0146-0404 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17652755 >.

KATO, M.; NATARAJAN, R. Diabetic nephropathy--emerging epigenetic mechanisms. **Nature reviews. Nephrology,** v. 10, n. 9, p. 517-30, Sep 2014. ISSN 1759-507X (Electronic)
1759-5061 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25003613 >.

KAUR, J.; DHAUNSI, G. S.; TURNER, R. B. Interleukin-1 and nitric oxide increase NADPH oxidase activity in human coronary artery smooth muscle cells. **Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre,** v. 13, n. 1, p. 26-9, Jan-Feb 2004. ISSN 1011-7571 (Print)
1011-7571 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657615 >.

KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature,** v. 526, n. 7575, p. 666-71, Oct 29 2015. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26375259 >.

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature,** v. 479, n. 7371, p. 117-21, Oct 16 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22002608 >.

KIKUCHI, C. et al. Aortic superoxide production at the early hyperglycemic stage in a rat type 2 diabetes model and the effects of pravastatin. **Biological & pharmaceutical bulletin,** v. 37, n. 6, p. 996-1002, 2014. ISSN 1347-5215 (Electronic)
0918-6158 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705256 >.

KOLLURU, G. K.; BIR, S. C.; KEVIL, C. G. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. **Int J Vasc Med,** v. 2012, p. 918267, 2012. ISSN 2090-2832 (Electronic)
2090-2824 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22611498 >.

KOWLURU, R. A. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. **Antioxidants & redox signaling,** v. 7, n. 11-12, p. 1581-87, Nov-Dec 2005. ISSN 1523-0864 (Print)
1523-0864 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356121 >.

KUBOKI, K. et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. **Circulation,** v. 101, n. 6, p. 676-81, Feb 15 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673261 >.

KUCHINO, Y. et al. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. **Nature,** v. 327, n. 6117, p. 77-9, May 7-13 1987. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3574469 >.

KUFER, T. A.; SANSONETTI, P. J. Sensing of bacteria: NOD a lonely job. **Curr Opin Microbiol,** v. 10, n. 1, p. 62-9, Feb 2007. ISSN 1369-5274 (Print)
1369-5274 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17161646 >.

LAING, S. P. et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. **Diabetologia,** v. 46, n. 6, p. 760-5, Jun 2003. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12774166 >.

LAMKANFI, M. et al. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. **Journal of leukocyte biology,** v. 82, n. 2, p. 220-5, Aug 2007. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442855 >.

LANDMESSER, U. et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. **Circulation,** v. 106, n. 24, p. 3073-8, Dec 10 2002. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473554 >.

LARSEN, C. M. et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. **The New England journal of medicine,** v. 356, n. 15, p. 1517-26, Apr 12 2007. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429083 >.

LEE, H. M. et al. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. **Diabetes,** v. 62, n. 1, p. 194-204, Jan 2013. ISSN 1939-327X (Electronic)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086037 >.

LEINONEN, J. et al. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **FEBS letters,** v. 417, n. 1, p. 150-2, Nov 3 1997. ISSN 0014-5793 (Print)
0014-5793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395094 >.

LEUNG, S. W.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: age, gender and blood pressure, do they matter? **Acta Physiol (Oxf),** v. 219, n. 1, p. 108-123, Jan 2017. ISSN 1748-1716 (Electronic)
1748-1708 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26548576 >.

LIU, J. et al. Circulating Cell Free Mitochondrial DNA is a Biomarker in the Development of Coronary Heart Disease in the Patients with Type 2 Diabetes. **Clin Lab,** v. 61, n. 7, p. 661-7, 2015. ISSN 1433-6510 (Print)
1433-6510 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299063 >.

LIU, J. et al. Circulating cell-free mitochondrial deoxyribonucleic acid is increased in coronary heart disease patients with diabetes mellitus. **Journal of diabetes investigation,** v. 7, n. 1, p. 109-14, Jan 2016. ISSN 2040-1124 (Electronic)
2040-1116 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816608 >.

LIU, P. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome induces vascular dysfunction in obese OLETF rats. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 468, n. 1-2, p. 319-25, Dec 4-11 2015. ISSN 1090-2104 (Electronic)
0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26514727 >.

LUO, B. et al. NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. **PLoS One,** v. 9, n. 8, p. e104771, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136835 >.

MAHMOUD, E. H. et al. Plasma Circulating Cell-free Nuclear and Mitochondrial DNA as Potential Biomarkers in the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP,** v. 16, n. 18, p. 8299-305, 2015. ISSN 2476-762X (Electronic)
1513-7368 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26745076 >.

MALIK, A. N. et al. Altered circulating mitochondrial DNA and increased inflammation in patients with diabetic retinopathy. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 110, n. 3, p. 257-65, Dec 2015. ISSN 1872-8227 (Electronic)
0168-8227 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26625720 >.

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

MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature,** v. 440, n. 7081, p. 237-41, Mar 9 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407889 >.

MASTERS, S. L. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. **Nature immunology,** v. 11, n. 10, p. 897-904, Oct 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20835230 >.

MATSUMOTO, S. et al. Azilsartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, restores endothelial function by reducing vascular inflammation and by increasing the phosphorylation ratio

Ser(1177)/Thr(497) of endothelial nitric oxide synthase in diabetic mice. **Cardiovascular diabetology,** v. 13, p. 30, Jan 31 2014. ISSN 1475-2840 (Electronic)
1475-2840 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24485356 >.

MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Alterations in EDHF-type relaxation and phosphodiesterase activity in mesenteric arteries from diabetic rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 285, n. 1, p. H283-91, Jul 2003. ISSN 0363-6135 (Print)
0363-6135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12793980 >.

MICELI-RICHARD, C. et al. CARD15 mutations in Blau syndrome. **Nature genetics,** v. 29, n. 1, p. 19-20, Sep 2001. ISSN 1061-4036 (Print)
1061-4036 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11528384 >.

MISHRA, M.; KOWLURU, R. A. Epigenetic Modification of Mitochondrial DNA in the Development of Diabetic Retinopathy. **Investigative ophthalmology & visual science,** v. 56, n. 9, p. 5133-42, Aug 2015. ISSN 1552-5783 (Electronic)
0146-0404 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26241401 >.

MONNINK, S. H. et al. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a comparison of three frequently reported tests. **J Investig Med,** v. 50, n. 1, p. 19-24, Jan 2002. ISSN 1081-5589 (Print)
1081-5589 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11820226 >.

MONTAGNANI, M. et al. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca2+ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). **The Journal of biological chemistry,** v. 276, n. 32, p. 30392-8, Aug 10 2001. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11402048 >.

MONTAGNANI, M. et al. Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. **Molecular endocrinology,** v. 16, n. 8, p. 1931-42, Aug 2002. ISSN 0888-8809 (Print)
0888-8809 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145346 >.

MOORE, K. J.; SHEEDY, F. J.; FISHER, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. **Nat Rev Immunol,** v. 13, n. 10, p. 709-21, Oct 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995626 >.

MURAKAMI, T. et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 109, n. 28, p. 11282-7, Jul 10 2012. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733741 >.

NAKAHIRA, K. et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nature immunology,** v. 12, n. 3, p. 222-30, Mar 2011. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21151103 >.

NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature,** v. 404, n. 6779, p. 787-90, Apr 13 2000. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783895 >.

PALOMO, J. et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family--Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. **Cytokine,** v. 76, n. 1, p. 25-37, Nov 2015. ISSN 1096-0023 (Electronic)
1043-4666 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185894 >.

PANENI, F. et al. Targeting prolyl-isomerase Pin1 prevents mitochondrial oxidative stress and vascular dysfunction: insights in patients with diabetes. **European heart journal,** v. 36, n. 13, p. 817-28, Apr 1 2015. ISSN 1522-9645 (Electronic)
0195-668X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24801072 >.

PARADIES, G. et al. Role of cardiolipin peroxidation and Ca2+ in mitochondrial dysfunction and disease. **Cell calcium,** v. 45, n. 6, p. 643-50, Jun 2009. ISSN 1532-1991 (Electronic)
0143-4160 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19368971 >.

PARK, J. B.; CHARBONNEAU, F.; SCHIFFRIN, E. L. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. **J Hypertens,** v. 19, n. 3, p. 415-20, Mar 2001. ISSN 0263-6352 (Print)
0263-6352 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11288811 >.

PAWATE, S.; BHAT, N. R. C-Jun N-terminal kinase (JNK) regulation of iNOS expression in glial cells: predominant role of JNK1 isoform. **Antioxid Redox Signal,** v. 8, n. 5-6, p. 903-9, May-Jun 2006. ISSN 1523-0864 (Print)
1523-0864 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16771680 >.

PAZMANDI, K. et al. Oxidative modification enhances the immunostimulatory effects of extracellular mitochondrial DNA on plasmacytoid dendritic cells. **Free radical biology & medicine,** v. 77, p. 281-90, Dec 2014. ISSN 1873-4596 (Electronic)
0891-5849 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25301097 >.

PERNOW, J.; JUNG, C. The Emerging Role of Arginase in Endothelial Dysfunction in Diabetes. **Current vascular pharmacology,** v. 14, n. 2, p. 155-62, 2016. ISSN 1875-6212 (Electronic)
1570-1611 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26638796 >.

PONTILLO, A. et al. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. **Autoimmunity,** v. 43, n. 8, p. 583-9, Dec 2010. ISSN 1607-842X (Electronic)
0891-6934 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370570 >.

QIN, C. et al. Release of mitochondrial DNA correlates with peak inflammatory cytokines in patients with acute myocardial infarction. **Anatolian journal of cardiology,** v. 17, n. 3, p. 224-228, Mar 2017. ISSN 2149-2271 (Electronic)
2149-2263 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27721319 >.

RIZZONI, D. et al. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation,** v. 103, n. 9, p. 1238-44, Mar 06 2001. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238267 >.

ROBERTS, R. L. et al. Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. **Genes and immunity,** v. 11, n. 4, p. 351-6, Jun 2010. ISSN 1476-5470 (Electronic)
1466-4879 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182451 >.

ROSCA, M. G. et al. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. **American journal of physiology. Renal physiology,** v. 289, n. 2, p. F420-30, Aug 2005. ISSN 1931-857X (Print)
1522-1466 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814529 >.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell,** v. 140, n. 6, p. 821-32, Mar 19 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303873 >.

SCHRODER, K.; ZHOU, R.; TSCHOPP, J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? **Science,** v. 327, n. 5963, p. 296-300, Jan 15 2010. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20075245 >.

SHARMA, N. K. et al. Morbidity and mortality in patients with diabetic retinopathy. **Trans Ophthalmol Soc U K,** v. 100, n. Pt 1, p. 83-9, Apr 1980. ISSN 0078-5334 (Print)
0078-5334 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6943838 >.

SHI, Y.; VANHOUTTE, P. M. Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. **Journal of diabetes,** v. 1, n. 3, p. 151-62, Sep 2009. ISSN 1753-0407 (Electronic)
1753-0407 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923534 >.

_____. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. **Journal of diabetes,** v. 9, n. 5, p. 434-449, May 2017. ISSN 1753-0407 (Electronic)
1753-0407 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28044409 >.

SHIMADA, K. et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. **Immunity,** v. 36, n. 3, p. 401-14, Mar 23 2012. ISSN 1097-4180 (Electronic)
1074-7613 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22342844 >.

SPITALER, M. M.; GRAIER, W. F. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. **Diabetologia,** v. 45, n. 4, p. 476-94, Apr 2002. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032623 >.

SRINIVASULA, S. M. et al. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. **The Journal of biological chemistry,** v. 277, n. 24, p. 21119-22, Jun 14 2002. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967258 >.

STIENSTRA, R. et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. **Cell metabolism,** v. 12, n. 6, p. 593-605, Dec 1 2010. ISSN 1932-7420 (Electronic)
1550-4131 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109192 >.

SUN, X. et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate insulin resistance by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in type 2 diabetes rats. **Stem cell research & therapy,** v. 8, n. 1, p. 241, Nov 2 2017. ISSN 1757-6512 (Electronic)
1757-6512 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29096724 >.

SUN, Y. et al. Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice. **Gastroenterology,** v. 144, n. 7, p. 1478-87, 1487 e1-8, Jun 2013. ISSN 1528-0012 (Electronic)
0016-5085 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470617 >.

TADDEI, S. et al. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. **Circulation,** v. 94, n. 6, p. 1298-303, Sep 15 1996. ISSN 0009-7322 (Print)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822983 >.

TONIOLO, A. et al. Antiinflammatory and antioxidant effects of H2O2 generated by natural sources in Il1beta-treated human endothelial cells. **Prostaglandins & other lipid mediators,** v. 121, n. Pt B, p. 190-8, Sep 2015. ISSN 1098-8823 (Print)
1098-8823 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26391839 >.

TSCHOPP, J.; MARTINON, F.; BURNS, K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. **Nature reviews. Molecular cell biology,** v. 4, n. 2, p. 95-104, Feb 2003. ISSN 1471-0072 (Print)
1471-0072 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563287 >.

URURAHY, M. A. et al. Increased TLR2 expression in patients with type 1 diabetes: evidenced risk of microalbuminuria. **Pediatric diabetes,** v. 13, n. 2, p. 147-54, Mar 2012. ISSN 1399-5448 (Electronic)
1399-543X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21848584 >.

VALLEJO, S. et al. The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovascular diabetology,** v. 13, p. 158, Dec 18 2014a. ISSN 1475-2840 (Electronic)
1475-2840 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25518980 >.

_____. The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol,** v. 13, p. 158, Dec 18 2014b. ISSN 1475-2840 (Electronic)
1475-2840 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25518980 >.

VAN DER HEIJDEN, T. et al. NLRP3 Inflammasome Inhibition by MCC950 Reduces Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice-Brief Report. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology,** v. 37, n. 8, p. 1457-1461, Aug 2017. ISSN 1524-4636 (Electronic)
1079-5642 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28596375 >.

VANHOUTTE, P. M. The endothelium--modulator of vascular smooth-muscle tone. **The New England journal of medicine,** v. 319, n. 8, p. 512-3, Aug 25 1988. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3405258 >.

VANHOUTTE, P. M.; TANG, E. H. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! **The Journal of physiology,** v. 586, n. 22, p. 5295-304, Nov 15 2008. ISSN 1469-7793 (Electronic)
0022-3751 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818246 >.

VIGITEL. **Vigitel Brasil 2016 : VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS**
CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não transmissíveis e Promoção de Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017. 2017.

WANG, J. et al. High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes. **Neuroscience,** v. 202, p. 58-68, Jan 27 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178606 >.

WANG, L. et al. PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing. **The Journal of biological chemistry,** v. 277, n. 33, p. 29874-80, Aug 16 2002. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019269 >.

WANG, W. et al. Rutin protects endothelial dysfunction by disturbing Nox4 and ROS-sensitive NLRP3 inflammasome. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie,** v. 86, p. 32-40, Feb 2017. ISSN 1950-6007 (Electronic)
0753-3322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27936392 >.

WISWEDEL, I. et al. Degradation of phospholipids by oxidative stress--exceptional significance of cardiolipin. **Free radical research,** v. 44, n. 2, p. 135-45, Feb 2010. ISSN 1029-2470 (Electronic)
1029-2470 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20092032 >.

YAO, L. et al. Prevention of diabetes-induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout. **Cardiovascular research,** v. 97, n. 3, p. 509-19, Mar 1 2013. ISSN 1755-3245 (Electronic)
0008-6363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250919 >.

YOUNG, T. A.; CUNNINGHAM, C. C.; BAILEY, S. M. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. **Archives of biochemistry and biophysics,** v. 405, n. 1, p. 65-72, Sep 1 2002. ISSN 0003-9861 (Print)
0003-9861 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176058 >.

ZENG, G. et al. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. **Circulation,** v. 101, n. 13, p. 1539-45, Apr 4 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747347 >.

ZENG, G.; QUON, M. J. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. **The Journal of clinical investigation,** v. 98, n. 4, p. 894-8, Aug 15 1996. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770859 >.

ZHANG, Q. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature,** v. 464, n. 7285, p. 104-7, Mar 04 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203610 >.

ZHANG, Y. et al. Coronary endothelial dysfunction induced by nucleotide oligomerization domain-like receptor protein with pyrin domain containing 3 inflammasome activation during hypercholesterolemia: beyond inflammation. **Antioxidants & redox signaling,** v. 22, n. 13, p. 1084-96, May 1 2015. ISSN 1557-7716 (Electronic)
1523-0864 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25739025 >.

ZHAO, Y. et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature,** v. 477, n. 7366, p. 596-600, Sep 14 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918512 >.

ZHENG, F. et al. Overexpression of caspase-1 in aorta of patients with coronary atherosclerosis. **Heart Lung Circ,** v. 23, n. 11, p. 1070-4, Nov 2014. ISSN 1444-2892 (Electronic)
1443-9506 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954757 >.

ZHENG, F. et al. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis. **Heart Lung Circ,** v. 22, n. 9, p. 746-50, Sep 2013. ISSN 1444-2892 (Electronic)
1443-9506 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462287 >.

ZHONG, Q.; KOWLURU, R. A. Role of histone acetylation in the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon. **Journal of cellular biochemistry,** v. 110, n. 6, p. 1306-13, Aug 15 2010. ISSN 1097-4644 (Electronic)
0730-2312 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20564224 >.

ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature,** v. 469, n. 7329, p. 221-5, Jan 13 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124315 >.

ZHU, J.; KRISHNEGOWDA, G.; GOWDA, D. C. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: the requirement of

extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. **J Biol Chem,** v. 280, n. 9, p. 8617-27, Mar 4 2005. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611045 >.

ZITVOGEL, L. et al. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. **Nature immunology,** v. 13, n. 4, p. 343-51, Mar 18 2012. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430787 >.

ANEXO

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação **nº 026/2015**, sobre o projeto intitulado *"Papel do inflamassoma NLRP1 e NLPR3 nas alterações vasculares promovidas pelo Diabetes tipo 1 em modelo induzido por estreptozotocina"*, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 28 de março de 2016.

We certify that the protocol ***nº* 026/2015,** entitled ***"Role of NLRP1 and NLRP3 inflammasome in vascular alterations caused by type 1 diabetes in streptozotocin-model"***, 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 the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *03/28/2016.*

Ribeirão Preto, 28 de março de 2016.

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