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

NATHANNE DOS SANTOS FERREIRA

**Ativação do inflamassoma NLRP3 contribui para a disfunção vascular induzida pela
aldosterona no diabetes mellitus tipo 2.**

RIBEIRÃO PRETO

2018

NATHANNE DOS SANTOS FERREIRA

Ativação do inflamassoma NLRP3 contribui para a disfunção vascular induzida pela aldosterona no diabetes mellitus tipo 2.

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

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.

Ferreira, Nathanne dos Santos

Ativação do inflamassoma NLRP3 contribui para a disfunção vascular induzida pela aldosterona no diabetes mellitus tipo 2.

157 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Passaglia, Rita de Cássia Aleixo Tostes

1. Diabetes Mellitus tipo 2. 2. Aldosterona. 3. Artérias Mesentéricas de Resistência. 4. Receptor Mineralocorticoide. 5. Receptor NLRP3.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERREIRA, N.S. Ativação do inflamassoma NLRP3 contribui para a disfunção vascular induzida pela aldosterona no diabetes mellitus tipo 2.

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

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia.

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Helena e Paulo, pelo incentivo, apoio e pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos Allyne e Ulisses, pela amizade, carinho e toda confiança depositada em mim. Aos meus pequenos Arthur e Giovanna, por terem transformado a minha vida trazendo mais amor e colorindo meus dias. A vocês, por serem a minha motivação diária, meu suporte, minha fonte de amor e inspiração para a realização dessa tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me iluminado e me guiado em todos os momentos que precisei. Obrigada pelas bênçãos derramadas em minha vida e por nunca ter me abandonado. Agradeço por sempre colocar pessoas especiais em meu caminho, tornando a minha jornada mais leve. Obrigada por me ajudar nas minhas escolhas e me direcionar para as melhores oportunidades, me fazendo enxergar quais são seus planos para mim. Entrego, Confio, Aceito e Agradeço.

À minha amada família, aqueles que me dão todo amor e me incentivam a buscar meus sonhos. À minha querida e amada mãe Maria Helena, ao meu querido pai Paulo, aos meus amados irmãos Allyne, Ulisses, aos que se tornaram meus irmãos Rafael, Kestherly e Kassila e aos meus pequenos sobrinhos Arthur e Giovanna por serem o meu porto seguro, a minha palavra de conforto e a minha força para lutar a cada dia para alcançar meus objetivos. Agradeço pelas orações, pelas lágrimas a cada despedida e pelos abraços apertados a cada reencontro. Agradeço o amor incondicional, os ensinamentos, o carinho e por me apoiarem cada um do seu jeito, pelas ligações, pelas palavras de carinho e pelo cuidado mesmo à distância seja nos momentos de alegria ou nos períodos mais difíceis. Agradeço à minha avó Rita Marcelina, aos meus avós José Victor e Laurinda (em memória), e a todos os tios, tias, primos e primas que torceram e me incentivaram para que eu finalizasse mais essa etapa da minha vida. O carinho de vocês permite que eu tenha confiança para superar todos os desafios.

À minha querida orientadora e mentora Professora Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia pela oportunidade de receber seus ensinamentos e pela confiança depositada em mim. Agradeço por todo carinho e pelo cuidado durante a minha trajetória na pós-graduação. Obrigada professora por sua dedicação, pela orientação firme e essenciais para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pelas oportunidades concedidas e por sempre se preocupar com o meu bem-estar e me ajudar nas minhas escolhas. Obrigada por ser esse exemplo de profissional, uma mulher generosa e humilde, que inspira a todos.

Agradeço ao querido Professor Fernando Carneiro pela amizade, pelos ensinamentos, pela paciência e conselhos durante essa trajetória. Agradeço pelo convívio diário, pela sua atenção nas sugestões e discussões e pelo papel de mentor em minha carreira profissional. Agradeço sua linda família Zidonia e Gabriel por me deixarem fazer parte do seu convívio e por me acolherem e demonstrarem seu cuidado e carinho por mim.

A querida Prof. Dra. Daniela Carlos, pelos conselhos e excelente contribuições para o desenvolvimento desse trabalho. Ao Prof. Dr. José Carlos Filho e seu aluno Douglas do laboratório de Imunofarmacologia pelas sugestões e auxílio nos experimentos de imunologia celular. A Prof Dra. Maria Cristina Foss pelas contribuições e por ter nos permitido trabalhar no Ambulatório de Diabetes.

Agradeço de maneira especial a todos os professores e colegas do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. De maneira especial agradeço às secretarias Gislaíne, Soninha e Fátima e ao Ramon pela atenção, disposição e apoio em todos os momentos.

Agradeço ao laboratório do Prof. Ernesto Schiffrin, ao Dr. Pierre Paradis por terem me recebido durante seis meses e por terem contribuído para a minha formação durante o doutorado sanduíche pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior-CAPEs, no Instituto Lady Davis, McGill University, Montreal, Canadá. Aos meus amigos do grupo PDSE-CAPEs que me deram suporte durante esse período.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por me concederem toda estrutura para realização desse trabalho e também ao programa CRID, às agências de fomento CAPEs, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

Agradeço à minha amiga e Professora Sandra Aparecida Benite Ribeiro pelo incentivo e por ser minha primeira mãe científica e despertar em mim o interesse pela busca do conhecimento. Aquela que com seu papel de mentora, sempre me dá conselhos e torce por mim. Aos professores Dr^a. Núbia Lobato e Dr. Fernando Filgueira por me proporcionarem a oportunidade de conhecer a professora Rita e pelo incentivo nesse período.

Aos meus queridos companheiros antigos e atuais de laboratório: Karla, Rhéure, Camila Zanotto, Camila André, Pedro Afonso, Vania, Emiliana, Marcondes, Thiago Dias, Thiago Bruder, Stêfany Cau, Rafael Menezes, Rafael Fais, Juliano, Aline, Josiane, Diane, Sara, Júlio, Allan, Fernanda Rodrigues, Daniel Rodrigues, Fernanda, Juliana, Isabela Orlandin e Fernanda Ramalho. As técnicas Carla Pavan, Giuliana e Fabíola. Agradeço pelos momentos de descontração, de alegria e pela ajuda. Em especial, agradeço a Carla Pavan por sempre cuidar tão bem dos meus animais. Vocês se tornaram muito mais que colegas de trabalho, mas sim amigos especiais e uma família.

Agradeço as minhas queridas amigas e minha outra família de Ribeirão Ludmila, Nathalia e Ana Paula. Obrigada meninas por compartilharem comigo seus dias, pelas demonstrações de carinho, pelo companheirismo, pelas confidências, pelos momentos de alegrias e descontração

depois de um dia de trabalho. Obrigada por me fazerem sentir em casa, me acolherem de braços abertos, e fazerem da nossa república um verdadeiro lar.

Agradeço de maneira especial aqueles que fizeram parte da minha trajetória em Ribeirão Preto e me deram todo o suporte emocional para que eu conseguisse finalizar essa etapa. À vocês meus queridos amigos, eu agradeço pelos milhares momentos de alegrias, pelos momentos de descontração, agradeço por escutarem minhas angustias nos momentos de sofrimento e por me motivarem a sempre buscar o meu melhor. Agradeço pelos conselhos, pelas excelentes discussões científicas que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço por serem meu refúgio, meu “abraço-casa” e por me devolverem os momentos de calma. Agradeço por serem fonte de inspiração pela força, pela luta diária, pela busca do conhecimento e reconhecimento da nossa profissão. Vocês foram, acima de tudo, a minha família de Ribeirão Preto e, como uma verdadeira família, cumpriram seu papel de oferecer amor de forma incondicional. Cito aqui os amigos especiais e verdadeiro irmãos: Camila André, Camila Zanotto, Edismauro Filho, Ludmila Lima, Pedro Afonso, o casal Rhéure Alves e Karla Bianca e Vania Olivon. Meus queridos amigos, saibam que mesmo que a distância ou até mesmo um oceano nos separe, vocês sempre terão um espaço especial reservado em meu coração. A companhia de vocês fez essa etapa mais prazerosa e a saudade de casa mais suportável,

Agradeço aos amigos que tornaram meus dias mais alegres e que compartilharam comigo todas as minhas conquistas, Daniela, Brisa, Taiz, Hugo, Pedro Gobira, Flávio. Aos colegas de departamento Atlante, Jéssica e Nicole. Aos colegas do Departamento de Fisiologia, Procópio Filho, Junia Lara, Mateus, Aline, Nikollas, Nayara.

Agradeço a minhas queridas amigas Ângara Nayane, Aline Monezi, Jackeline Oliveira, Mayara Vila-Verde, Taíza Márcia e a nossa pequena Melissa Márcia, pelo incentivo, pela alegria dos reencontros e pela palavra amiga. Minhas lindas biomédicas, vocês me mostraram que a ausência física não abala o sentimento verdadeiro de amizade. Tenho certeza que sempre estaremos torcendo pela felicidade umas das outras. Obrigada por serem pessoas tão especiais e pela amizade sincera.

A todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação, seja por um gesto, uma palavra amiga, um incentivo ou dando força para que esse objetivo fosse alcançado, meus mais sinceros agradecimentos.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

RESUMO

FERREIRA, N.S. **Ativação do inflamassoma NLRP3 contribui para a disfunção vascular induzida pela aldosterona no diabetes mellitus tipo 2.** 2018. 157 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2), uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, é marcado pela presença de complicações micro e macrovasculares, as quais estão associadas à disfunção endotelial, inflamação e fibrose. A aldosterona, cujos níveis plasmáticos estão elevados em pacientes e modelos experimentais de DM2, aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a expressão de marcadores inflamatórios. As citocinas IL-1 β e IL-18 são liberadas principalmente após ativação de plataformas moleculares denominadas inflamassomas, as quais incluem os receptores NLRP3. Recentemente, demonstramos que o receptor NLRP3 contribui para a disfunção vascular induzida pela aldosterona. Considerando a existência de evidências que a aldosterona, via receptor mineralocorticoide (MR) e NLRP3, induz a produção de mediadores inflamatórios e, consequentemente, ativação do inflamassoma, podendo assim contribuir para o processo inflamatório no diabetes, nós hipotetizamos que o bloqueio de receptores MR e NLRP3 previne a ativação do inflamassoma e reduz o desenvolvimento das alterações vasculares funcionais associadas ao DM2. Observamos que artérias mesentéricas de animais diabéticos apresentam aumento da expressão/ativação de caspase-1 e IL-1 β , aumento dos níveis plasmáticos de IL-1 β , aumento da atividade da caspase-1 em macrófagos do lavado peritoneal e prejuízo no relaxamento dependente de endotélio, comparativamente a artérias do grupo controle. Os tratamentos com espironolactona (antagonista MR) e MCC950 (inibidor de receptor NLRP3) atenuam a disfunção vascular, reduzem a expressão e a atividade da caspase-1 e diminuem os níveis plasmáticos de IL-1 β . Células de músculo liso vascular e macrófagos derivados da medula estimulados com aldosterona também apresentam aumento da expressão dos componentes do inflamassoma, o que poderia contribuir para as alterações observadas em animais diabéticos. Pacientes com DM2 apresentam correlação positiva entre os níveis de aldosterona e de IL-1 β e/ou glicemia. Em conclusão, nosso estudo demonstra que a aldosterona induz disfunção vascular e processo inflamatório no diabetes tipo 2 através da ativação de MR e do inflamassoma NLRP3.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 2, aldosterona, receptor mineralocorticoide, receptor NLRP3, artérias mesentéricas de resistência.

ABSTRACT

FERREIRA, N.S. **NLRP3 inflammasome activation contributes to aldosterone-induced vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus.** 2018. 157 p. Thesis (Ph.D.), Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2018.

Type 2 diabetes mellitus (T2DM), a disease that affects millions of people around the world, is marked by the presence of micro and macrovascular complications, which are associated with endothelial dysfunction, inflammation and fibrosis. Aldosterone excess aggravates endothelial dysfunction in diabetes by promoting insulin resistance, fibrosis, oxidative stress and inflammation. Aldosterone activates the molecular platform inflammasome in cells of the immune system, an event that contributes to vascular dysfunction induced by the mineralocorticoid hormone. However, it is unclear whether activation of the inflammasome contributes to the effects of aldosterone in diabetes-associated vascular abnormalities. In the present study we tested the hypothesis that aldosterone induces vascular dysfunction in T2DM via activation of mineralocorticoid receptors (MR) and assembly of the NLRP3 inflammasome. To determine whether aldosterone activates the NLRP3 inflammasome and NLRP3 activation contributes to diabetes-associated vascular dysfunction, mesenteric arteries from control mice (db/m) and mice with type 2 diabetes (db/db), treated with vehicle, spironolactone (MR antagonist) or the NLRP3 antagonist MCC950, were used. Db/db mice exhibited increased vascular expression/activation of caspase-1 and IL-1 β , increased plasma IL-1 β levels, increased number of caspase-1-positive macrophages in the peritoneal lavage as well as reduced acetylcholine (ACh) vasodilation, compared to control db/m mice. Treatment of db/db mice with spironolactone and MCC950 reduced vascular caspase-1, decreased plasma IL-1 β levels and partly restored ACh responses. Spironolactone treatment also reduced the number of caspase-1-positive-macrophages in db/db mice. Vascular smooth muscle cells and bone marrow-derived macrophages stimulated with aldosterone also exhibited increased expression of inflammatory components, which may contribute to diabetes-associated vascular changes. Patients with T2DM exhibited a correlation between aldosterone and IL-1 β levels and/or glycemia. In conclusion, our study demonstrates that aldosterone induces vascular dysfunction and inflammatory process in type 2 diabetes through MR receptor activation and NLRP3 inflammation.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, aldosterone, mineralocorticoid receptor, inflammasome NLRP3, mesenteric resistance arteries.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
Aldo	Aldosterona
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Fator de transcrição ativador de proteína-1
ASC	Proteína associada a apoptose
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Ca²⁺	Cálcio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CARD	Domínio para recrutamento da caspase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMLV	Células de músculo liso vascular
CO₂	Dióxido de carbono
Cont	Controle
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
Ct	Limiar do ciclo
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano celular
db/db	Camundongos com depleção do receptor de leptina
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DOCA	Desoxicorticosterona
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Emax	Efeito máximo produzido por um agonista
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
E.P.M.	Erro padrão da média
ERK1/2	Quinase regulada por sinalização extracelular 1/2
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Espiro	Espironolactona
ET-1	Endotelina-1

GMPC	Monofosfato de guanosina cíclico
GPGR	Receptor de Estrógeno acoplado à Proteína G
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IFN-γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-1R	Receptor de interleucina-1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IRS	Substrato do receptor de insulina
K⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Regiões ricas em leucina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCC950	Inibidor do receptor NLRP3
MCP-1	Proteína quimiotática de macrófagos
MgSO₄.7H₂O	Sulfato de magnésio heptahidratado
min	Minuto
mN	MiliNewton
MR	Receptor mineralocorticoide
NaCl	Cloreto de Sódio
NACHT	Domínio de oligomerização com um nucleotídeo central
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
Nig	Nigericina
NLR	Receptor intracelular do tipo NOD
NLRP3	Receptores NOD contendo proteínas-NACHT-LRR-PYD

O₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPN	Osteopontina
PAMP	Padrões moleculares associados a patógeno
PBS	Tampão salina fosfato
<i>pD</i>₂	Logaritmo negativo da concentração que induz 50% do efeito máximo
PE	Fenilefrina
PYD	Pirina
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RAG-I	Camundongos com ausência de linfócitos B e T maduros
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
SHRSP	Ratos espontaneamente hipertensos propensos a acidentes vasculares cerebrais
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TLR	Receptor intracelular do tipo Toll
T-reg	Células T reguladoras
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
URL	Unidades relativas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hipótese de trabalho: Aldosterona induz disfunção vascular no diabetes tipo 2 via ativação de receptores mineralocorticoides (MR) e do NLRP3 inflamassoma, contribuindo para as complicações vasculares e para o processo inflamatório nesta doença.....	29
Figura 2. Atividade de caspase-1 e clivagem da citocina pró-inflamatória IL-1 β em células de músculo liso vascular (CMLV) estimuladas com aldosterona.	46
Figura 3. Atividade da caspase-1 em macrófagos derivados da medula óssea estimulados com aldosterona.	48
Figura 4. Valores de massa corporal e glicemia em animais controle e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona.	50
Figura 5. Curvas concentração-efeito para PE e ACh em artérias mesentéricas de resistência de animais controle e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona.	51
Figura 6. Valores de Emáx para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou espironolactona.....	52
Figura 7. Espironolactona reduz a expressão vascular de IL-1 β em camundongos db/db.	53
Figura 8. Níveis plasmáticos da citocina IL-1 β no soro de animais controle e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona.....	54
Figura 9. Atividade de caspase-1 em células totais e macrófagos do lavado peritoneal.	55
Figura 10. Curvas concentração-efeito para PE e ACh em artérias mesentéricas de resistência de animais controle e diabéticos incubadas com veículo ou MCC950.	56
Figura 11. Valores de Emáx para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina dos grupos controle e diabético em artérias incubadas com veículo ou MCC950..	57
Figura 12. MCC950 não altera a massa corporal e os valores glicêmicos de camundongos diabéticos.	59
Figura 13. Curvas concentração-efeito para PE e ACh em artérias mesentéricas de resistência de animais controle e diabéticos tratados com veículo ou MCC950.....	60
Figura 14. Valores de Emáx para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina nos grupos controle e diabético tratados com veículo ou MCC950..	61

Figura 15. MCC950 não altera a expressão vascular de caspase-1 e NLRP3 em artérias de camundongos db/db.	62
Figura 16. Tratamento com o inibidor do receptor NLRP3 não altera a expressão de caspase-1 e IL-1 β no lavado peritoneal de camundongos controle e db/db.	63
Figura 17. MCC950 diminui os níveis plasmáticos da citocina IL-1 β , mas não altera os níveis de aldosterona em camundongos db/db.	64
Figura 18. Correlação entre os níveis de aldosterona, IL-1 β e glicemia em camundongos controle e db/db tratados com veículo ou MCC950.	65
Figura 19. MCC950 abole a geração de espécies reativas de oxigênio em artérias mesentéricas de camundongos db/db.	66
Figura 20. MCC950 reduz a geração de espécies reativas de oxigênio em artérias mesentéricas estimuladas com aldosterona.	67
Figura 21. Níveis plasmáticos de IL-1 β e aldosterona em voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2.	68
Figura 22. Valores de aldosterona, IL-1 β e glicemia em pacientes com níveis variáveis de aldosterona.	69
Figura 23. Correlação entre os níveis de aldosterona, IL-1 β e glicemia em relação aos voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2.	70
Figura 24. Expressão de caspase-1 no plasma de voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2.	71
Figura 25. Expressão de IL-1 β no plasma de voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2.	72
Figura 26. Esquema geral relacionando a disfunção vascular às ações da aldosterona mediadas por MR e NLRP3 no diabetes mellitus tipo 2.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados.....	43
Tabela 2. Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou espironolactona.	52
Tabela 3. Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético incubadas com veículo ou MCC950 por 1 hora.	57
Tabela 4. Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou MCC950.	61
Tabela 5. Informações dos voluntários saudáveis e pacientes com diagnóstico de diabetes tipo 2.....	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 DIABETES MELLITUS.....	19
1.2 ALDOSTERONA E DIABETES.....	21
1.3 ALDOSTERONA E INFLAMAÇÃO	22
1.4 ALDOSTERONA E INFLAMASSOMA NLRP3.....	24
2. HIPÓTESE	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. ANIMAIS.....	33
4.1.1. Tratamento com antagonista mineralocorticoide (espironolactona).....	33
4.1.2. Tratamento com inibidor de NLRP3 (MCC950).....	34
4.1.3. Massa corporal e glicemia	34
4.1.4. Teste oral de tolerância à glicose.....	34
4.2. ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR.....	35
4.2.1. Preparo dos anéis de artérias mesentéricas de resistência isoladas.....	35
4.2.2 Normalização das artérias mesentéricas de resistência	35
4.2.3. Protocolos experimentais	36
4.2.3.1. Efeitos do tratamento com espironolactona sobre a contração induzida por PE e na vasodilatação induzida por ACh.....	36
4.2.3.2. Efeitos da incubação in vitro com inibidor de NLRP3, MCC950 sobre a contração induzida por PE e vasodilatação induzida por ACh.....	36
4.2.3.3. Efeitos do tratamento com MCC950 sobre a contração induzida por PE e vasodilatação induzida por ACh	37
4.3. CULTURA CELULAR.....	37
4.3.1. Cultura de células de músculo liso vascular.....	37
4.3.2. Cultura de macrófagos derivados da medula óssea.....	38
4.3.3. Protocolos experimentais	38
4.4. LAVADO PERITONEAL	39
4.4.1. Coleta de células do lavado peritoneal	39
4.5. ATIVIDADE DA CASPASE-1	39
4.6. CITOMETRIA DE FLUXO.....	39
4.7. ELISA.....	40
4.8. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	41

4.9. PROTOCOLOS MOLECULARES	41
4.9.1. <i>Western blotting</i>	42
4.10. DROGAS E SAIS UTILIZADOS.....	43
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5. RESULTADOS	46
5.1. Aldosterona aumenta a expressão dos componentes do inflamassoma em células de músculo liso vascular.	46
5.2. Aldosterona aumenta a atividade da caspase-1 em macrófagos derivados da medula óssea.	48
5.3. Efeito do tratamento com espironolactona sobre a glicemia e massa corporal nos grupos controle e diabético.	49
5.4. Efeito do tratamento com espironolactona na função de artérias mesentéricas de resistência dos grupos controle e diabético.	51
5.5. Efeito do tratamento com espironolactona na expressão de componentes do inflamassoma em artérias mesentéricas de camundongos controle e db/db.	53
5.6. Efeito agudo do inibidor do receptor NLRP3 na função de artérias mesentéricas de resistência dos grupos controle e diabético.	56
5.7. Efeito do tratamento com inibidor do receptor NLRP3 sobre a massa corporal e glicemia em camundongos dos grupos controle e db/db.....	58
5.8. Efeito do tratamento com MCC950 na função de artérias mesentéricas de resistência dos grupos controle e diabético.	60
5.9. Efeito do tratamento com MCC950 sobre os componentes do inflamassoma e níveis de aldosterona em camundongos controle e db/db.....	62
5.10. Correlação entre os níveis plasmáticos de aldosterona, citocina IL-1 β e glicemia nos grupos controle e diabético tratados com veículo e MCC950.....	65
5.11. Participação de receptores MR e NLRP3 na geração de espécies reativas de oxigênio em artérias de camundongos controle e db/db e em artérias estimuladas com aldosterona.	66
5.12. Níveis plasmáticos de aldosterona, IL-1 β e glicemia e correlação entre estas variáveis em voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2.	68
5.13. Expressão dos componentes do inflamassoma em voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo mellitus tipo 2.....	71
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO.....	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	96
ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética	96
ANEXO B – Artigo Relacionado à Tese	99
ANEXO C – Artigo Não Relacionado à Tese.....	133

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que representa um problema grave de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o DM é considerado uma das quatro principais doenças não transmissíveis que necessitam ações de líderes mundiais. O DM afeta milhões de pessoas em todo o mundo e o número de casos, assim como a prevalência de diabetes, tem aumentado constantemente ao longo das últimas décadas (Who, 2016).

O DM é caracterizado, entre outros fatores, pelo aumento dos níveis plasmáticos de glicose, o que contribui para o surgimento de complicações microvasculares e macrovasculares. Alterações no sistema vascular desempenham papel crucial nas principais complicações clínicas atribuídas ao diabetes (A.D.A., 2003; Huysman e Mathieu, 2009). As alterações vasculares, as quais podem ser estruturais e/ou funcionais, tanto na microcirculação como na macrocirculação, estão associadas à disfunção de células endoteliais, células de músculo liso vascular (CMLV), processo inflamatório e aumento de fatores coagulantes. Os danos vasculares também contribuem para a elevação do risco de doenças cardiovasculares, por ocasionarem lesões em vários órgãos-alvo como coração, cérebro, olhos, rins e nervos, acarretando em complicações graves como acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, cegueira, insuficiência renal e amputações (A.D.A., 2003; Hile e Veves, 2003; Huysman e Mathieu, 2009). Estes fatos justificam a importância de se estudar os mecanismos relacionados às alterações vasculares associadas ao diabetes.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Who, 2006), o diabetes pode ser classificado em Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2, Diabetes Gestacional e outros tipos de Diabetes. O Diabetes Mellitus do tipo 1 (DM1) é causado por destruição das células β pancreáticas, levando à deficiência absoluta de insulina. É causado por mecanismo autoimune associado à presença de autoanticorpos tipo antidescarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina. No Diabetes gestacional observam-se altos níveis de glicose no sangue durante a gravidez, gerando complicações para a mãe e o bebê. Outras formas de diabetes estão associadas a defeitos genéticos na função das células β e na ação da insulina, a doenças no pâncreas exócrino e a drogas ou tratamentos que induzem diabetes.

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é responsável por 90% dos casos de diabetes. É caracterizado pela resistência à ação e disfunção na secreção da insulina. O DM2 é associado ao excesso de peso ou obesidade, o que, por si, pode causar resistência à insulina e levar a altos

níveis de glicose no sangue. Segundo a OMS, um a cada três adultos estão com sobrepeso e uma a cada dez pessoas são obesas, resultado do excesso de consumo de dieta não saudável e falta de atividade física, contribuindo para o aumento dos casos de diabetes (Who, 2016).

A Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation* - IDF) estimou que, em 2013, 382 milhões de pessoas no mundo apresentavam diabetes, indicando a prevalência de 8,3% na população mundial. Em 2017, o número de pessoas estimadas com diabetes foi de 425 milhões, o que corresponde a uma em cada onze pessoas apresentando DM. Em 2013, o Brasil era o quarto país com maior número de pessoas por área territorial com diabetes. Em 2017, o Brasil continuou na mesma posição e gastou cerca de 24 bilhões de dólares com cuidados básicos relacionados ao diabetes. Estima-se que em 2030 o Brasil ainda permanecerá nessa posição com cerca de 19,6 milhões de pessoas com diabetes (Whiting *et al.*, 2011; Guariguata, 2012; I.D.F., 2012; 2013; 2017).

O diagnóstico de DM pode ser feito por exames laboratoriais de rotina utilizando amostras de sangue para avaliar os níveis plasmáticos de glicose. Os valores considerados para estabelecer o diagnóstico de diabetes por várias entidades, como a Organização Mundial de Saúde - OMS (Who, 2012), Associação Americana de Diabetes (A.D.A., 2013) e Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2006), são: glicemia de jejum – ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L) e glicemia plasmática 2 horas após ingestão da dose oral de 75 gramas de glicose – ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L).

O DM2 é muitas vezes não diagnosticado e os estudos para avaliar o número de casos recém-ocorridos são complicados e, conseqüentemente, quase não há dados sobre a incidência real. A descoberta tardia do diabetes acarreta em complicações em órgãos-alvos, as quais geralmente são observadas quando se identifica a doença. No Brasil estima-se que 6.126.485 de pessoas não tenham o diagnóstico de DM. Considerando a população mundial, um em cada dois adultos com DM não são diagnosticados, ou seja, mais de 212 milhões de pessoas (Who, 2016; I.D.F., 2017).

Os efeitos prejudiciais do DM estão diretamente associados a alterações vasculares, principalmente devido ao impacto deletério da hiperglicemia que contribui para a disfunção endotelial. A disfunção endotelial é caracterizada principalmente por redução do relaxamento dependente de endotélio, na maioria das vezes em consequência do desequilíbrio entre a biodisponibilidade de óxido nítrico (De Vriese *et al.*, 2000) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Gryglewski *et al.*, 1986). Adicionalmente, observa-se aumento de fatores vasoconstritores (Yanagisawa *et al.*, 1988; Schneider *et al.*, 2002). Esse desequilíbrio, com redução de fatores relaxantes e aumento de fatores vasoconstritores, está presente em várias

doenças como diabetes (Oelze *et al.*, 2010), hipertensão arterial (Cooper *et al.*, 2007; Manrique *et al.*, 2009) e aterosclerose (Beckman *et al.*, 2013; Paneni *et al.*, 2013).

1.2 ALDOSTERONA E DIABETES

A aldosterona é um hormônio mineralocorticoide sintetizado principalmente na zona glomerular do córtex da suprarrenal (Tait *et al.*, 1952). A síntese de aldosterona também ocorre em tecidos extra-adrenais, como sistema nervoso central (Stromstedt e Waterman, 1995; Mackenzie *et al.*, 2000) e sistema cardiovascular (miocárdio e células da musculatura lisa vascular) (Takeda *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 2005; Lombes, 2009). Recentemente, sua síntese foi demonstrada também em adipócitos (Briones *et al.*, 2012). Vários fatores contribuem para a produção e liberação de aldosterona em situações fisiológicas; entre eles, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (*renin angiotensin aldosterone system* – RAAS) (Carpenter, Davis e Ayers, 1961; Davis *et al.*, 1961; Ganong e Mulrow, 1961; Davis *et al.*, 1962; Takeda *et al.*, 1996), liberação de adreconocorticotropina (Farrell, Banks e Koletsky, 1956; Bartter, 1958) e aumento da concentração dos íons potássio (K^+) (Bartter, 1958; Ganong e Mulrow, 1958; Dluhy *et al.*, 1972).

A aldosterona exerce seus efeitos devido à ativação de receptores mineralocorticoides (MR) e de vias genômicas ou não genômicas. As vias genômicas estão relacionadas à regulação da transcrição e expressão de diferentes genes e proteínas. A ativação de mecanismos não genômicos da aldosterona está relacionada a vias rápidas de sinalização e ativação tanto de MR como de receptor de estrógeno acoplado à proteína G (*G protein-coupled estrogen receptor* – GPER) (Gros *et al.*, 2011; Gros *et al.*, 2013).

Diversos estudos demonstram efeitos deletérios do excesso de aldosterona em doenças cardiovasculares. A produção de ERO é um dos principais mecanismos pelos quais a aldosterona contribui para a disfunção vascular no diabetes. No sistema vascular, a geração de ERO induzida pela aldosterona ocorre através da ativação da enzima NAD(P)H oxidase via MR e mecanismos não genômicos (Johar *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2007; Stas *et al.*, 2007). Adicionalmente, outros efeitos desse hormônio podem estar relacionados às alterações vasculares no diabetes, incluindo processos inflamatórios e fibróticos, como será discutido a seguir, e resistência às ações da insulina, resultante por exemplo da degradação e heterodimerização do substrato do receptor de insulina (IRS-1 e -2) e/ou inibição da produção dos transportadores de glicose (Hitomi *et al.*, 2007; Lastra-Lastra *et al.*, 2009; Luther e Brown, 2011; Sherajee *et al.*, 2012).

A relação direta entre os níveis plasmáticos de aldosterona e diabetes é apontada por diferentes estudos tanto em humanos como em modelos animais. Hollenberg e colaboradores mostraram que pacientes com DM1 apresentam aumento nos níveis plasmáticos de aldosterona (Hollenberg *et al.*, 2004). Uma possível associação entre aldosterona e resistência à insulina é evidenciada em pacientes com adenomas produtores de aldosterona (Catena *et al.*, 2006; Tsurutani *et al.*, 2017) e em pacientes com insuficiência cardíaca (Colussi *et al.*, 2007; Freel *et al.*, 2009). Estudo conduzido por 10 anos, em população que não apresentava resistência à insulina no início do estudo, demonstrou que níveis plasmáticos aumentados de aldosterona permitem prever o desenvolvimento de resistência à insulina (Kumagai *et al.*, 2011).

Camundongos com depleção do receptor de leptina - camundongos db/db, modelo animal de DM2 que desenvolve resistência à insulina - também apresentam aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona, o que contribui diretamente para a disfunção vascular observada nesse modelo (Briones *et al.*, 2012). Estudos do nosso grupo evidenciaram que camundongos diabéticos db/db tratados com espironolactona, antagonista MR, por 6 semanas apresentam melhora do relaxamento vascular dependente de endotélio, redução da produção de ERO, diminuição da expressão de proteínas quinases relacionadas ao processo de contração vascular, além de diminuição de fatores relacionados ao remodelamento vascular, como aumento do antígeno de proliferação celular nuclear e colágeno (Silva, Bruder-Nascimento, *et al.*, 2015; Silva, Cau, *et al.*, 2015). Outros pesquisadores também destacaram a participação dos MR na disfunção e remodelamento vascular em camundongos db/db (Guo *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Hirata *et al.*, 2009; Ferreira, N. S. *et al.*, 2015). Resultados provenientes da minha dissertação de mestrado mostraram que a disfunção vascular em animais db/db induzida por aldosterona está também associada à ativação de receptores GPER (Ferreira, N. S. *et al.*, 2015).

1.3 ALDOSTERONA E INFLAMAÇÃO

Além de alterações na reatividade vascular, a aldosterona também estimula processos inflamatórios e fibróticos. Uma das primeiras descrições do potencial fibrótico da aldosterona foi feita por Brilla e colaboradores, que evidenciaram a deposição de colágeno no coração de ratos infundidos com aldosterona (Brilla *et al.*, 1990), a qual foi revertida pelo tratamento com espironolactona, antagonista MR (Brilla *et al.*, 1993).

Tecidos cardíacos de ratos infundidos com aldosterona apresentam aumento da expressão de moléculas de adesão, como molécula de adesão intercelular-1 (*intercellular adhesion*

molecule 1 - ICAM-1) e molécula de adesão celular-vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule 1* - VCAM-1) e, adicionalmente, apresentam infiltrado de macrófagos (células inflamatórias ED-1 positivas). O infiltrado inflamatório é precedido pelo aumento da expressão gênica, ou de RNA mensageiro (mRNA), de outros mediadores como ciclo-oxigenase-2 (COX-2), proteína quimiotática de macrófagos (*macrophage chemoattractant protein-1*, MCP-1), e osteopontina (OPN). Além disso, as artérias coronárias desses animais mostram lesões severas, caracterizadas pelo infiltrado de monócitos/macrófagos com sinais de isquemia focal e alterações necróticas. O tratamento com antagonista de MR atenua a expressão desses marcadores no coração dos ratos e reduz as lesões vasculares e miocárdicas (Rocha *et al.*, 2002).

Na doença cardiovascular há uma relação direta entre aldosterona, inflamação e estresse oxidativo (Sun *et al.*, 2002). O aumento da produção de ERO induzido por aldosterona, além de induzir danos diretos na vasculatura, estimula a transcrição de um dos principais fatores responsáveis pela expressão de moléculas inflamatórias, o fator nuclear kappa B (*nuclear factor-κB* - NF-κB) (Schreck *et al.*, 1991; Savoia e Schiffrin, 2007; Brown, 2008; Queisser e Schupp, 2012). A ativação de NF-κB induz a transcrição e a expressão gênica e proteica de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas inflamatórias (Li e Verma, 2002; Gloire *et al.*, 2006). Animais infundidos com aldosterona apresentam aumento da ativação de NF-κB e do fator de transcrição ativador de proteína-1 (*activator protein 1* - AP-1), além de infiltrado inflamatório no coração e nos rins (Tostes *et al.*, 2002; Terada *et al.*, 2012). As lesões induzidas pela aldosterona e o processo inflamatório estão associados à ativação de MR mas, em parte, também são mediados pela ativação de receptores para endotelina-1 (ET-1) (Rocha *et al.*, 2002; Tostes *et al.*, 2002; Blasi *et al.*, 2003).

No diabetes, os níveis elevados de aldosterona contribuem para o aumento de marcadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral-alfa (*tumor necrosis factor α*- TNF-α), MCP-1, fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor-beta* - TGF-β) e interleucina (IL) IL-1β (Goren *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008). Guo e colaboradores (2006) mostraram que o uso de antagonista de MR, eplerenona, reduz a albuminúria e citocinas inflamatórias como TGF-β e OPN, além de reduzir importantes sinais de lesão renal em ratos e camundongos diabéticos. Esse mesmo grupo também demonstrou que o bloqueio de MR reduz a expressão de fatores pró-inflamatórios e pró-trombóticos no tecido adiposo, um importante órgão capaz de produzir e secretar citocinas (ou adipocinas) pró-inflamatórias. O uso de eplerenona aumentou a expressão de adiponectina (adipocina anti-inflamatória) no coração e tecido adiposo de ratos obesos e diabéticos (Guo *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008).

A contribuição da aldosterona para o processo inflamatório não é restrita somente à produção de mediadores inflamatórios. A aldosterona possui importante papel na ativação, diferenciação e ação das células do sistema imune. A influência da aldosterona na regulação das células do sistema imune, com consequentes efeitos cardiovasculares, foi demonstrada pela primeira vez pelo grupo do Prof. David Harrison. Camundongos deficientes RAG-1 (camundongos com ausência de linfócitos B e T maduros) não apresentam disfunção vascular em resposta à infusão de angiotensina II e/ou aldosterona (Guzik *et al.*, 2007). Considerando as ações da aldosterona em linfócitos, outros grupos de pesquisa, como o grupo do Prof. Ernesto Schiffrin, demonstraram que animais infundidos com aldosterona apresentam diminuição no número de células T reguladoras (T-reg) e aumento no número de linfócitos Th17, linfócitos que liberam IL-17 – citocina pró-inflamatória (Kasal *et al.*, 2012; Amador *et al.*, 2014).

1.4 ALDOSTERONA E INFLAMASSOMA NLRP3

Nos últimos anos vem crescendo o número de estudos que avaliam a ativação de receptores da imunidade inata e os possíveis mecanismos pelos quais estes receptores contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Em particular, os receptores expressos na superfície das membranas ou em vesículas intracelulares do tipo Toll (*Toll-like receptors* - TLRs), os receptores intracelulares do tipo NOD (*NOD-like receptors* - NLRs), além de outros tipos de receptores, levam à formação de plataformas moleculares denominadas inflamassomas. O inflamassoma é ativado aos primeiros sinais de injúria, após os receptores reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano celular (*damage-associated molecular patterns* - DAMPs). Após ativação, o inflamassoma induz a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento de processo inflamatório.

Os receptores do tipo NOD são formados por três domínios que consistem em um domínio de ligação ou região C-terminal com repetições ricas em leucina (*leucine-rich repeat*, LRR), um domínio de oligomerização com um nucleotídeo central (NACHT – cujo nome deriva das proteínas nele presentes [*NAIP* (*NLP family apoptosis inhibitor protein*), *CIITA* (*C2TA ou MHC class II transcription activator*), *HET-E* (*incompatibility locus protein from Podospora anserina*) e *TEP1* (*telomerase-associated protein*)], e um domínio efetor N-terminal. A região N-terminal é responsável pela função efetora do receptor e pode conter domínios para recrutamento de caspase (*caspase activation and recruitment domains*, CARD), pirina (*pyrin domain* - PYD), inibidores de baculovírus de apoptose repetidos (*Baculovirus inhibitor of*

apoptosis protein repeat, BIR) ou receptor para interleucina-1 (*Toll/interleukin-1 receptor*, TIR) (Tschopp, 2011).

Os NALPs (receptores NOD que contém proteínas-NACHT-LRR-PYD) constituem uma subfamília dos NLRs e possuem o domínio pirina em sua porção N-terminal, ao qual se associa a proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein* - ASC). Os receptores NLRP3 (ou NALP3) e NLRP1 (ou NALP1), membros dessa subfamília, são alguns dos receptores mais estudados. O NLRP3, após detectar DAMPs e/ou PAMPs, se oligomeriza de maneira dependente de ATP e recruta uma pirina, o domínio CARD e a proteína ASC, culminando no recrutamento da proteína pró-caspase-1. Após clivagem proteolítica, a proteína caspase-1 é ativada e cliva pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas, IL-1 β e IL-18, respectivamente.

Além dos PAMPs e DAMPs, moléculas de glicose, ceramidas, colesterol e ERO podem ativar o inflamassoma. Os DAMPs são produzidos em diferentes células, potencialmente pela mitocôndria e diretamente ou indiretamente por ativadores do inflamassoma (Martinon, 2010; Tschopp, 2011; Wenceslau *et al.*, 2014). A aldosterona pode ser um importante ativador do inflamassoma, uma vez que o seu excesso pode alterar diversas funções das células, aumentando a produção de ERO e, consequentemente, a liberação de DAMPs mitocondriais.

O grupo de Doi e colaboradores (2014) foi um dos primeiros a mostrar que modelo animal de hipertensão arterial induzida por aldosterona e sal apresenta aumento da pressão arterial e dos componentes do inflamassoma no rim. Ratos infundidos com aldosterona apresentam maior infiltrado de linfócitos T e de macrófagos, de marcadores inflamatórios renais como MCP-1, TNF- α e IL-1 β , bem como maior expressão renal de caspase-1 e do receptor NLRP3. O tratamento com mizoribina, droga imunossupressora, atenua o dano e a fibrose renal, reduz a expressão dos componentes do inflamassoma, além de reduzir os níveis pressóricos dos animais (Doi *et al.*, 2014).

Camundongos tratados com análogo da aldosterona, desoxicorticosterona (DOCA), e sal também apresentam aumento da pressão arterial e da expressão renal dos componentes do inflamassoma. Uma vez que o receptor NLRP3 é composto por 3 domínios e recruta proteínas adaptadoras para desempenhar sua função, camundongos nocautes para a proteína adaptadora ASC (ASC $^{-/-}$) foram utilizados para avaliar a importância desses componentes no desenvolvimento da hipertensão e lesões renais. Camundongos deficientes para ASC não apresentam aumento da pressão arterial e da expressão de mediadores inflamatórios renais, ou acúmulo de macrófagos e colágeno. Adicionalmente, o tratamento com o inibidor do receptor

NLRP3, MCC950, reduz os valores pressóricos e marcadores inflamatórios como TNF- α , IL-6, OPN e IL-17A em animais DOCA-sal (Krishnan *et al.*, 2016).

Considerando o papel dos componentes do inflamassoma no desenvolvimento da hipertensão arterial e lesão renal, a contribuição da IL-1 β também foi avaliada. Foi observado que o tratamento com anakinra, antagonista do receptor de IL-1, reduz a pressão arterial de camundongos tratados com DOCA-sal. Entretanto, não altera o infiltrado inflamatório, apesar de diminuir parcialmente a expressão de alguns dos mediadores inflamatórios renais (Ling *et al.*, 2016).

As evidências acima demonstram a importância dos componentes do inflamassoma no aumento da pressão arterial e na lesão renal induzida pela aldosterona. Estudos do nosso grupo adicionaram importantes peças nesse quebra-cabeça que envolve o receptor NLRP3, a aldosterona e disfunção vascular. Demonstramos que camundongos infundidos com aldosterona apresentam disfunção vascular, ou seja, aumento na resposta contrátil, prejuízo no relaxamento dependente de endotélio, além de remodelamento vascular, aumento de moléculas de adesão e do número de macrófagos aderentes na aorta. Animais nocautes para o receptor NLRP3, NLRP3^{-/-}, ou nocautes para componentes da plataforma inflamassoma, como caspase-1 (caspase-1^{-/-}) e receptor para IL-1 β (IL-1 β R), não apresentam as alterações vasculares induzidas por aldosterona. Somado a esses resultados, demonstramos a participação do sistema imune no prejuízo vascular induzido pela aldosterona, uma vez que a transferência de células da medula óssea de animais NLRP3^{-/-} para animais selvagens é capaz de atenuar parcialmente a disfunção vascular e a expressão de mediadores inflamatórios (Bruder-Nascimento *et al.*, 2016).

Os receptores NLRP3 e NLRP1 já foram associados à resistência à insulina e à indução de obesidade. Animais NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} e caspase-1^{-/-} são resistentes a indução de obesidade induzida por dieta rica em gordura e, conseqüentemente, são protegidos da resistência à insulina induzida pela obesidade. Indivíduos obesos com diabetes tipo 2 submetidos a dieta com restrição de calorias e perda de peso mediada por exercício físico apresentam redução da expressão de NLRP3 no tecido adiposo, bem como diminuição da inflamação e melhora na sensibilidade à insulina. Além disso, camundongos obesos NLRP3^{-/-} apresentam redução da expressão de IL-18, interferon- γ (IFN- γ) e do número de linfócitos T efetores no tecido adiposo (Stienstra *et al.*, 2011; Vandanmagsar *et al.*, 2011).

A IL-1 β , uma das citocinas liberadas após a ativação do inflamassoma, está associada à disfunção vascular, estresse oxidativo e inflamação em modelo animal de DM1 e o tratamento com antagonista do receptor para IL-1 β , anakinra, melhora todos esses parâmetros (Vallejo *et*

al., 2014). Pacientes com diabetes tipo 2 tratados com anakinra apresentam melhora dos níveis glicêmicos, da função secretora das células beta e redução de marcadores inflamatórios (Larsen *et al.*, 2007). Em camundongos db/db, o receptor NLRP3 foi associado a alterações no sistema nervoso central, como ansiedade e depressão, e o tratamento com o inibidor do inflamassoma NLRP3, MCC950, melhora esses distúrbios, além de reduzir a expressão de marcadores do inflamassoma no hipocampo e melhorar a sensibilidade a insulina (Zhai *et al.*, 2018).

Sendo assim, as evidências acima indicam que o diabetes é doença associada à ativação do inflamassoma e que a aldosterona é um importante ativador de NLRP3, levando à disfunção vascular e alterações cardiovasculares e renais. Entretanto, necessita-se investigar a relação entre aldosterona, diabetes e ativação do inflamassoma NLRP3, bem como a participação de receptores MR neste processo. Partindo deste pressuposto, a nossa hipótese é que aldosterona leva à ativação do inflamassoma e, consequentemente, contribui para as alterações inflamatórias e vasculares no DM2. Dessa forma, investigamos se o bloqueio de receptores MR e do receptor NLRP3 reduz a expressão/ativação dos componentes do inflamassoma e a produção de mediadores inflamatórios, inibe a produção de ERO e previne o desenvolvimento das alterações vasculares funcionais associadas ao DM2.

2. HIPÓTESE

Considerando que:

- Diabetes é uma doença crônica e o número de casos têm aumentado constantemente ao longo das últimas décadas;
- Alterações vasculares são as principais causas de complicações associadas ao diabetes;
- Os níveis de aldosterona estão aumentados no diabetes tipo 2;
- Aldosterona contribui para a disfunção vascular e estresse oxidativo, via ativação de MR, no diabetes;
- Aldosterona induz produção de mediadores pró-inflamatórios, contribuindo para o processo inflamatório e disfunção vascular no diabetes;
- Aldosterona contribui para disfunção vascular via ativação de receptores NLRP3;

Formulamos a seguinte hipótese de trabalho:

Aldosterona induz disfunção vascular no diabetes mellitus tipo 2 via ativação de receptores mineralocorticoides (MR) e do NLRP3 inflamassoma, contribuindo para as complicações vasculares e para o processo inflamatório nesta doença.

A aldosterona, sendo uma potente estimuladora de vias pró-inflamatórias e pró-fibróticas relacionadas à disfunção vascular e às complicações observadas no diabetes, pode ser importante ativadora do inflamassoma. Dessa maneira, é importante investigar o papel da aldosterona via MR na ativação da resposta imune inata ou, mais especificamente, na ativação de NLRP3.

Figura 1. Hipótese de trabalho: Aldosterona induz disfunção vascular no diabetes tipo 2 via ativação de receptores mineralocorticoides (MR) e do NLRP3 inflamassoma, contribuindo para as complicações vasculares e para o processo inflamatório nesta doença.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi investigar se a aldosterona induz ativação do inflamassoma NLRP3, via ativação de MR, e se este mecanismo imunológico contribui para o desenvolvimento das alterações vasculares funcionais associadas ao DM2.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar se a aldosterona promove ativação do inflamassoma NLRP3 em células de músculo liso vascular e macrófagos.
- 2) Avaliar se o tratamento com antagonista de MR, espironolactona, melhora a função vascular em artérias de camundongos db/db.
- 3) Determinar se camundongos db/db, cujo níveis de aldosterona são elevados, apresentam ativação de receptores NLRP3 em artérias mesentéricas de resistência.
- 4) Avaliar se o antagonismo do MR com espironolactona previne a ativação e expressão dos componentes do inflamassoma NLRP3 em artérias de camundongos diabéticos db/db.
- 5) Investigar se o uso do inibidor do receptor NLRP3, MCC950, melhora a função vascular dos animais diabéticos e reduz a ativação e expressão dos componentes do inflamassoma em artérias de camundongos db/db.
- 6) Averiguar se os receptores MR e NLRP3 contribuem para a geração de ERO e se as mesmas são capazes de ativar o inflamassoma.
- 7) Determinar se pacientes com DM2 apresentam aumento nos níveis plasmáticos de aldosterona e de IL-1 β – o que indica ativação do inflamassoma - e se existe uma correlação entre estas variáveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Os protocolos que envolvem uso de animais em experimentação estão em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Guia ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brasil (protocolo nº 80/2015).

Foram utilizados machos de camundongos geneticamente diabéticos db/db, da linhagem B6.BKS-*Lepr^{db}* e seus respectivos controles (B6.BKS-*Lepr^{db}/+* ou B6.BKS+/+), com 10 a 16 semanas de idade, provenientes da colônia mantida no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, a qual foi iniciada a partir de camundongos da linhagem B6.BKS-*Lepr^{db}/+* adquirida da empresa The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). O grupo db/db (B6.BKS-*Lepr^{db}*) será denominado a partir de agora como grupo diabético ou db/db. Estes animais são homozigotos para uma mutação no receptor de leptina e desenvolvem diabetes no início da vida, além de apresentarem níveis plasmáticos aumentados de aldosterona. Os camundongos controle (B6.BKS-*Lepr^{db}/+* ou B6.BKS+/+) serão apresentados como grupo controle.

Foram utilizados machos de camundongos da linhagem C57BL/6 com 10 a 12 semanas de vida, provenientes do Biotério Central do Campus USP Ribeirão Preto.

Os animais foram mantidos em ciclos claro / escuro de 12 horas (h) com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e com acesso a ração e água *ad libitum*.

4.1.1. Tratamento com antagonista mineralocorticoide (espironolactona)

Camundongos db/db e controles foram tratados com veículo ou espironolactona por 6 semanas. A espironolactona (antagonista de receptores mineralocorticoides) foi administrada na dose de 50 mg/kg/dia, misturada à ração. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) grupo controle tratado com veículo; 2) grupo controle tratado com espironolactona; 3) grupo diabético tratado com veículo; 4) grupo diabético tratado com espironolactona.

O consumo de ração e a massa corporal foram avaliados a cada semana para acompanhar o desenvolvimento e a necessidade de ajuste da dose administrada aos animais. A glicemia dos animais também foi avaliada semanalmente.

4.1.2. Tratamento com inibidor de NLRP3 (MCC950)

Camundongos db/db e controles foram tratados com veículo ou inibidor do receptor NLRP3 (MCC950) por 2 semanas. MCC950 foi administrado na dose de 10 mg/kg/dia. O tratamento foi feito a cada dois dias, o que correspondia a administração de 20 mg/Kg/a cada dois dias, via intraperitoneal, sempre no mesmo horário. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) grupo controle tratado com veículo; 2) grupo controle tratado com MCC950; 3) grupo diabético tratado com veículo; 4) grupo diabético tratado com MCC950.

A massa corporal e os valores glicêmicos foram avaliadas a cada 3 dias para acompanhar o desenvolvimento e a necessidade de ajuste da dose administrada aos animais.

4.1.3. Massa corporal e glicemia

A massa corporal dos animais foi avaliada antes e durante os tratamentos com espirolactona ou MCC950 utilizando uma balança de precisão (WTB 2000, RADWAG®, Polônia). Para a dosagem da glicemia, o sangue foi retirado após corte na ponta da cauda e colocado em fitas individuais e a leitura foi realizada por glicosímetro (Accu-Check® Active, Roche, Mannheim, Alemanha).

4.1.4. Teste oral de tolerância à glicose

A realização do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) baseou-se em estudos anteriores (Silva, Bruder-Nascimento, *et al.*, 2015; Silva, Cau, *et al.*, 2015). Ao final do tratamento, os animais ficaram em jejum por 8 h e, após esse período, a glicemia de jejum foi verificada, caracterizando a glicemia do tempo zero. O sangue foi coletado após corte na ponta da cauda e colocado em fitas individuais e a leitura foi realizada em glicosímetro. Após a coleta da glicemia em jejum, uma sobrecarga de glicose, na dose de 2 g/kg por gavagem, foi administrada aos animais. A partir desse momento, foram realizadas novas coletas de amostras de sangue para verificação da glicemia nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos (min) após administração da glicose.

4.2. ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR

4.2.1. *Preparo dos anéis de artérias mesentéricas de resistência isoladas*

Após a eutanásia dos animais por inalação em câmara de dióxido de carbono (CO₂), o leito mesentérico foi removido e colocado em uma placa de Petri e ramos de segunda ordem da artéria mesentérica (150-200 mm de diâmetro) foram dissecados em solução de Krebs-Henseleit modificada (composição em mM: NaCl 130; KCl 4,7; NaHCO₃ 14,9; CaCl₂ 1,6; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄·7H₂O 1,17; EDTA 0,026 e glicose 5,5). O segundo ramo da artéria mesentérica superior foi dissecado e cortado em segmentos de 2,0 mm de comprimento com o auxílio de uma lupa. Dois fios de tungstênio (25 µm de diâmetro) foram então inseridos no lúmen das artérias.

Os anéis foram montados em miógrafo para vasos de resistência (modelo 610M; Danish Myo Technology – DMT, Copenhagen, Dinamarca) para o estudo da tensão isométrica. O miógrafo foi conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab8/8SP, ADInstruments, Austrália) e este, acoplado a um computador. Os canais do miógrafo foram preenchidos com solução de Krebs gaseificada com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de CO₂ e aquecida à 37 °C. Esses procedimentos foram realizados conforme descrito por Mulvany e Halpern (Mulvany e Halpern, 1977).

4.2.2 *Normalização das artérias mesentéricas de resistência*

O propósito do procedimento de normalização é distender o segmento vascular até que se atinja a chamada circunferência interna normalizada (IC₁), definida como uma fração determinada da circunferência interna (IC₁₀₀) que um segmento totalmente relaxado teria em uma determinada pressão transmural. Para artérias mesentéricas de resistência, a pressão transmural alvo é de 100 mmHg, que corresponde a 13,3 kPa.

Após o período de estabilização e aquecimento dos segmentos vasculares (10 min) em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4 e a 37 °C), as artérias mesentéricas foram distendidas de forma gradativa e a leitura do micrômetro e da força aplicada foram registrados a cada ponto. Estes dados foram convertidos em valores de circunferência interna (µm) e de tensão na parede vascular (mN/mm), respectivamente. A plotagem da tensão na parede do vaso contra a circunferência interna revela uma curva exponencial. Pela aplicação da curva isobárica correspondente a 100 mmHg, a IC₁₀₀ foi então calculada a partir do ponto de interseção,

utilizando o software específico para normalização de artérias de resistência (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália). A IC_1 foi calculada a partir da IC_{100} por meio da fórmula $IC_1 = 0,90 \times IC_{100}$, produzindo uma circunferência interna na qual a produção de força ativa bem como a sensibilidade do segmento a agonistas é máxima. O diâmetro interno normalizado foi calculado dividindo-se IC_1 por π .

4.2.3. Protocolos experimentais

Após 30 min do processo de normalização, as artérias foram contraídas com cloreto de potássio (KCl, 120 mM), com a finalidade de avaliar sua integridade funcional. Após um período de lavagem e estabilização por mais 20 min, a integridade do endotélio foi testada por meio da avaliação do relaxamento à acetilcolina (ACh, 10^{-5} mol/L – vasodilatador dependente de endotélio) em vasos pré-contraídos com fenilefrina (PE, 3×10^{-6} mol/L – agonista alfa adrenérgico). A ausência de relaxamento à ACh foi critério de exclusão dos vasos para os experimentos. Dessa maneira, todos os protocolos experimentais foram realizados em vasos com endotélio. A resposta vasoconstritora induzida pela PE foi expressa como porcentagem em relação aos valores de contração de KCl e a vasodilatação induzida pela ACh, como porcentagem em relação à pré-contração com PE.

4.2.3.1. Efeitos do tratamento com espironolactona sobre a contração induzida por PE e na vasodilatação induzida por ACh

Para verificar os efeitos do tratamento do antagonista mineralocorticoide sobre a contração vascular induzida pela PE nos grupos controle e diabético, curvas concentração-resposta cumulativas para PE (10^{-10} – 10^{-5} mol/L) foram realizadas em artérias mesentéricas dos animais tratados com veículo ou espironolactona. No mesmo sentido, com o intuito de averiguar os efeitos do tratamento com espironolactona sobre a vasodilatação induzida por ACh nos grupos controle e diabético, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} – 3×10^{-5} mol/L) foram realizadas em artérias mesentéricas pré-contraídas com PE.

4.2.3.2. Efeitos da incubação *in vitro* com inibidor de NLRP3, MCC950 sobre a contração induzida por PE e vasodilatação induzida por ACh

Para verificar os efeitos *in vitro* da incubação com inibidor do receptor NLRP3 sobre a contração vascular induzida pela PE nos grupos controle e diabético, curvas concentração-

resposta cumulativas para PE (10^{-10} – 10^{-5} mol/L) foram realizadas em artérias mesentéricas incubadas com veículo ou MCC950 por 1 h. Os efeitos da incubação *in vitro* com MCC950 sobre a vasodilatação induzida por ACh também foram avaliados nos grupos controle e diabético. Dessa maneira, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} – 3×10^{-5} mol/L) foram realizadas em artérias mesentéricas pré-contraídas com PE e incubadas por 1 h com veículo ou MCC950.

4.2.3.3. Efeitos do tratamento com MCC950 sobre a contração induzida por PE e vasodilatação induzida por ACh

Para verificar os efeitos do tratamento por 2 semanas com inibidor do receptor NLRP3 sobre a contração vascular induzida pela PE nos grupos controle e diabético, curvas concentração-resposta cumulativas para PE (10^{-10} – 10^{-5} mol/L) foram realizadas em artérias mesentéricas dos animais tratados com veículo ou MCC950. Os efeitos do tratamento com MCC950 sobre a vasodilatação induzida por ACh também foram avaliados. Dessa maneira, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} – 3×10^{-5} mol/L) foram realizadas em artérias mesentéricas pré-contraídas com PE dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou MCC950.

4.3. CULTURA CELULAR

4.3.1. Cultura de células de músculo liso vascular

Células de músculo liso vascular (CMLV) em culturas provenientes do mesentério de camundongos C57BL/6 foram utilizadas. Os mesentérios foram isolados e incubados em meio de cultura Ham's F12. Em seguida, foi realizada, em ambiente estéril, a remoção mecânica do tecido adiposo com o auxílio de uma pinça. Posteriormente, as artérias limpas foram incubadas com uma mistura de enzimas [em 12,5 mL de meio Ham's F12: 25 mg de albumina sérica bovina (BSA), 25 mg de collagenase, 1,5 mg de elastase e 4,5 mg de inibidor de tripsina], por 40 min, a 37 °C, em rotação, para digestão e remoção da camada endotelial. Após esse procedimento, a solução foi passada por gradiente de agulhas de diferentes calibres (16G, 18G e 20G), visando a ruptura dos vasos por atrito e obtenção de uma solução homogênea. A solução foi filtrada (filtro de nylon de 100 µm) para separação das CMLV. O produto final foi centrifugado [2000 rotações por minuto (rpm), 5 min, temperatura ambiente]. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspensão em meio Eagle modificado por Dulbecco

(DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em placas de Petri. As células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C, e o meio de cultura trocado após 24 h. Para cada protocolo de cultura de células da musculatura lisa vascular do leito mesentérico foram utilizados 5 animais.

4.3.2. Cultura de macrófagos derivados da medula óssea

Os macrófagos foram isolados a partir da medula óssea do fêmur de camundongos C57BL6/J. Após dissecação do fêmur, a medula óssea foi removida e a suspensão celular centrifugada a 2000 rpm a 4 °C por 10 min. O *pellet* formado foi ressuspensionado em meio RPMI-1640, contendo 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM: L929 - *cell conditioned medium*), 20% de SFB, 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina), 0,12% fungicida (Fungizona) e 2 mM de L-glutamina. As células foram colocadas em placas de cultivo e incubadas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C por sete dias.

Após sete dias de incubação, os macrófagos foram coletados com tampão salina-fosfato (PBS) gelado, contados em câmara de Neubauer e plaqueados em meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB. Os estímulos foram realizados de acordo com cada protocolo experimental, como descrito a seguir.

4.3.3. Protocolos experimentais

Para os protocolos de estímulo, foram utilizadas CMLV em cultura entre a quarta e a sexta passagens, provenientes de diferentes culturas primárias. Após confluência celular na placa de Petri, as CMLV foram privadas de SFB, por 12 h, para torná-las quiescentes e, a seguir, foram realizados os estímulos. As células foram estimuladas com aldosterona (10⁻⁷ mol/L por 4 h), após pré-incubação com lipopolissacarídeo (*lipopolysaccharide* - LPS - 1 µg/mL por 4 h) ou veículo. As CMLV foram utilizadas para avaliar a ativação de caspase-1 e produção de IL-1β, além da expressão de componentes do inflamassoma. Todos os experimentos incluíram estimulação com LPS+Nigericina (20 µM), usados como controle positivo para ativação do inflamassoma.

Para os macrófagos, os estímulos foram realizados em meio RPMI-1640 acrescido de fator estimulante de colônias de macrófagos. Macrófagos foram estimulados com aldosterona (10⁻⁷ mol/L por 4 h) após pré-incubação com lipopolissacarídeo (*lipopolysaccharide* - LPS - 1 µg/mL por 4 h) ou veículo. Os macrófagos foram utilizados para avaliar a ativação de caspase-

1. Todos os experimentos incluíram estimulação com LPS+Nigericina (20 μ M), usados como controle positivo para ativação do inflamassoma.

4.4. LAVADO PERITONEAL

4.4.1. Coleta de células do lavado peritoneal

Após o tratamento com espironolactona ou MCC950, os camundongos foram sacrificados e foi realizada a coleta da suspensão celular do lavado peritoneal com 3 mL de PBS com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Foi realizada a contagem total de células do lavado peritoneal utilizando-se contador automático de células (Coulter®ACT; Coulter Corporation, Miami, Florida, EUA).

4.5. ATIVIDADE DA CASPASE-1

A marcação da caspase-1 ativa foi realizada com o reagente carboxyfluorescein FLICA (FAM–YVAD–FMK, Immunochemistry Technologies, LLC), como recomendado pelo fabricante.

Macrófagos do lavado peritoneal ou cultura de macrófagos estimulados foram incubados com o reagente FLICA por 1 h a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas cinco vezes com PBS contendo 10% de SFB e a fluorescência foi determinada em aparelho FACSCantoII (Becton & Dickson®, San Jose, CA, EUA). Após a leitura das células no citômetro, as análises foram realizadas por meio do software “FlowJo” (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.6. CITOMETRIA DE FLUXO

No intuito de avaliar a atividade da caspase-1 em macrófagos do lavado peritoneal foram realizadas marcações específicas para macrófago e para FLICA.

Suspensão de macrófagos (1 x 10⁶ células/tubo) foi incubada com 100 mL do bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas (anticorpo proveniente de sobrenadante de hibridoma de anti-CD16/CD32, *Fc block*), para evitar ligações inespecíficas, por 20 min a 4 °C. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais extracelulares F4/80 (eBioscience, Waltham, EUA) para os macrófagos em geral, por 30 min a 4 °C.

Após a incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com 2 ml de PBS contendo 2% de SFB, centrifugadas a 400 g, a 4 °C, por 10 min e ressuspensas em 80 µl de solução de PBS contendo 1% de formaldeído. Após esses procedimentos, as amostras foram passadas no citômetro de fluxo FACSCanto (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ, EUA). As análises foram realizadas utilizando-se o programa software “FlowJo”, o qual permite analisar todas as células adquiridas (50.000 eventos/gate de F4/80⁺/amostra), individualizadas por janelas (*gates*).

Ao realizar a análise dos macrófagos, foi traçada uma janela nos *singlet* (células únicas), baseando-se nos parâmetros de tamanho em altura (*forward side scatter – FSC, height*) e tamanho em área (*forward side scatter – FSC, area*) para excluir os *doublets* (células agrupadas). Em seguida, as células da região R1 foram distribuídas segundo os parâmetros de complexidade (SSC- *side light scatter*) e tamanho (FSC- *forward side scatter*) e traçada uma janela específica para os macrófagos (R2), baseando-se na população celular. Finalmente, as células delimitadas pelas regiões R1 e R2 foram somadas e distribuídas num parâmetro de Caspase-1+. A população presente no quadrante direito superior foi considerada macrófagos com atividade positiva para caspase-1.

4.7. ELISA

A quantificação de citocinas e dos níveis de aldosterona no soro foi realizada por método imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) que se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas.

Para obtenção do soro, o sangue obtido dos animais tratados com veículo, espironolactona ou MCC950 foi centrifugado a 1500 rpm a 4 °C por 15 min. As amostras de soro foram armazenadas em freezer -80 °C até a realização dos experimentos.

Aldosterona foi avaliada no soro de voluntários saudáveis e pacientes diabéticos e nos diferentes grupos animais usando o Kit de ELISA para dosagem de aldosterona [Aldosterone ELISA kit (Abcam, Cambridge, Reino Unido)].

Os ensaios para quantificação de IL-1β e IL-1α foram realizados conforme descrito pelo fabricante dos kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Em resumo, em placas de 96 poços foram adicionados 50 µL/poço de soluções contendo os anticorpos de captura para cada citocina (anti-IL-1β murino 800 ng/ml). Os anticorpos foram diluídos em PBS acrescido de 10% de SFB e incubados nas placas por 12 h à 4 °C.

Posteriormente, as placas foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0,05%). As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 μ L de PBS acrescido de 1% de BSA, por 120 min, em temperatura ambiente. As amostras e a curva padrão em volume final de 50 μ L/poço foram colocadas nas placas e incubadas por 12 h à 4 °C.

Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20 (0,05%) e 50 μ L dos anticorpos de detecção biotinilados específicos para cada citocina foram adicionados. Após 1 h, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20 (0,05%) e estreptoavidina-HRP (fornecida pelo fabricante do kit e diluída 1:250) foi adicionada aos poços. Após 30 min de incubação, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20 (0,05%), e 100 μ L do substrato tetrametilbenzidina - 1 mg/mL, acrescido de 0,06% de peróxido de hidrogênio, foram colocados em cada poço. As placas foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico (1 M) e a densidade óptica aferida à 450 nm em espectrofotômetro (FlexStation 3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em picogramas/ml.

4.8. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A geração de ânion superóxido em artérias mesentéricas foi avaliada por ensaio de quimiluminescência, utilizando a lucigenina comoceptor de elétrons e NAD(P)H como substrato. O procedimento foi realizado em artérias de animais controle e db/db ou C57/BL6 incubadas com aldosterona, na presença do antagonista MR, inibidor de NLRP3 ou veículo. As artérias foram colocadas em tubos individuais no tampão de trabalho (50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA e 150 mM sacarose, pH 7,4). Os ensaios foram realizados com 100 μ L de amostra, lucigenina (5 μ M), NAD(P)H (0,1 mM) e tampão. A luminescência foi medida por 30 ciclos de 18 segundos cada. A geração de ânion superóxido foi expressa em unidades relativas de luminescência pelo peso seco do tecido em relação à intensidade do controle.

4.9. PROTOCOLOS MOLECULARES

A expressão proteica dos componentes de vias do inflamassoma e dos receptores NLRP3 foram determinados pela técnica de *western blotting* em células estimuladas ou em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético tratados com veículo, espirolactona ou MCC950.

4.9.1. Western blotting

Células de músculo liso vascular e artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético foram utilizadas para avaliar a expressão dos componentes do inflamassoma. Após os estímulos específicos em CMLV, 100 µL de tampão de lise gelado (Triton-X-100 1%, Tris 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil, 2 mM e aprotinina 0,01 mg/mL) foi adicionado a cada poço. As células foram removidas, colocadas em tubos Eppendorf e congeladas em nitrogênio líquido. As artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético foram isoladas, o tecido adiposo perivascular foi removido e as mesmas foram congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram pulverizadas e homogeneizadas em tampão de lise gelado. Os extratos teciduais em tampão de lise foram centrifugados a 13000 rpm, a 4 °C, por 15 min para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o conteúdo proteico total foi quantificado, utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo ditiotreitol 200 mM e 40 a 50 µg de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) com dodecil sulfato de sódio em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, USA). Em cada gel havia um marcador com pesos moleculares de valores estabelecidos.

A transferência das proteínas separadas no gel para a membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente, por meio de aparelho da BioRad, por 1 h, a 100 V. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A membrana de nitrocelulose foi incubada com uma solução bloqueadora TBS-T [Tris 10 mM, cloreto de sódio (NaCl) 150 mM e Tween 20 0,02%] contendo 5% de BSA a 25 °C durante 1 h para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram incubadas com anticorpos específicos para avaliar proteínas da plataforma do inflamassoma e vias de sinalização.

As incubações com diferentes anticorpos primários foram feitas com solução bloqueadora TBS-T contendo 1% de BSA *overnight* na geladeira (4 °C) e a concentração de cada anticorpo variou de 1:500 a 1:10000. Em seguida, as membranas foram lavadas com a solução bloqueadora por 1 h e, posteriormente, incubadas com o segundo anticorpo, conjugado com peroxidase por 1 h, em temperatura ambiente. As bandas foram detectadas após incubação com ECL (*Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*). A emissão de luz foi detectada e visualizada por fotodocumentador ImageQuant 350 (*GE Healthcare Piscata Way, NJ, EUA*). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da

utilização de programa de análise de intensidade de bandas (ImageJ®, NIH, USA). Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados

Alvo	Diluição	Marca
Pro-caspase-1/Caspase-1	1:500	Novus Biologicals (NB100-56565F)
Pro-IL-1 β /IL-1 β	1:500	Santa Cruz Biotechnology (sc-7884)
NLRP3	1:500	R&D (MAB7578)
β -actina	1:3000	Cell Signaling Technology 4967L
GAPDH	1:10000	Sigma-Aldrich (G9545-100UL)

4.10. DROGAS E SAIS UTILIZADOS

Cloridrato de fenilefrina, cloreto de acetilcolina, aldosterona, espironolactona, lipopolissacarídeo [lipopolysaccharide (L4130)], nigericina [nigericin (N7143)], MCC950 (CP-456773 sodium salt) foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). Inibidor de protease, ortovanadato de sódio, Tween, BSA, Triton, EDTA e PMSF foram adquiridos da Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, EUA); DTT foi adquirido da Millipore (Burlington, MA, EUA); Tris, glicerol, mercaptoetanol e SDS foram obtidos da Synth® (Diadema, SP, Brasil). Todos os outros sais utilizados foram obtidos da Merck® (Kenilworth, NJ, EUA.). Para a cultura celular RPMI-1640 e L-glutamina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e soro fetal bovino (SFB), antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) e fungicida (Fungizona) foram adquiridos da Gibco (Waltham, MA, EUA).

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As curvas concentração-efeito individuais foram plotadas em curva sigmoidal pela análise de regressão não linear. Estas curvas, por sua vez, fornecem o pD_2 (definida como o logaritmo negativo dos valores de EC_{50} – concentração que produz 50% da resposta máxima) e a resposta máxima (E_{max}). Os valores de pD_2 e de resposta máxima foram comparados por meio da análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Bonferroni. Outras análises foram feitas utilizando o teste t de Student ou ANOVA de uma via. O programa Prisma, versão

6.0 (GraphPad Software Inc., San. Diego, CA, USA) foi utilizado para analisar estes parâmetros, bem como para a construção das curvas sigmóides e demais gráficos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). O nível de significância mínima determinado foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Aldosterona aumenta a expressão dos componentes do inflamassoma em células de músculo liso vascular.

Para determinar se a aldosterona ativa os componentes do inflamassoma em células vasculares, CMLV foram estimuladas *in vitro* com aldosterona. Pela técnica de western blotting avaliamos a marcação da caspase-1 (Figura 2A) e da citocina IL-1 β (Figura 2B) em CMLV estimuladas por 4 h com aldosterona 10⁻⁷ M. O estímulo com aldosterona em CMLV não aumentou significativamente a expressão da caspase-1 (Veículo: 0,99 $\pm$ 0,01; LPS + Nigericina: 2,04 $\pm$ 0,21; Aldo: 1,60 $\pm$ 0,24; LPS + Aldo: 2,25 $\pm$ 1,71; $p > 0,05$). Entretanto, aldosterona na presença de LPS aumentou a expressão de IL-1 β (Figura 2B) em sua forma ativa (clivada) em relação as células estimuladas com veículo (Veículo: 0,99 $\pm$ 0,01; LPS: 3,45 $\pm$ 1,89; LPS + Nigericina: 6,05 $\pm$ 2,08 Aldo: 3,77 $\pm$ 1,52; LPS + Aldo: 9,97 $\pm$ 3,11; $p < 0,05$).

Figura 2. Atividade de caspase-1 e clivagem da citocina pró-inflamatória IL-1 β em células de músculo liso vascular (CMLV) estimuladas com aldosterona. No topo, imagens representativas do western blot para caspase-1 (A) e IL-1 β (B) em CMLV estimuladas com aldosterona 10⁻⁷ M (Aldo) ou Aldo 10⁻⁷ M após lipopolissacarídeo (LPS); controle positivo: LPS+Nigericina (Nig). Na parte inferior, os gráficos mostram a razão de caspase-1/pro-caspase-1 (A) e de IL-1 β /pró-IL-1 β (B) pelo normalizador

(β -actina) (n= 3-6/grupo). One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Veículo. Aldo: Aldosterona, LPS: Lipopolisacarídeo e Nig: Nigericina.

5.2. Aldosterona aumenta a atividade da caspase-1 em macrófagos derivados da medula óssea.

A atividade da caspase-1 em macrófagos derivados da medula óssea foi avaliada em células estimuladas *in vitro* com aldosterona na presença de LPS ou veículo e a atividade da caspase-1 foi determinada pela técnica de FLICA. Macrófagos estimulados com LPS e nigericina apresentaram aumento da atividade de caspase-1 quando comparados ao grupo estimulado com veículo e aldosterona. O estímulo com aldosterona na ausência de LPS não aumentou a atividade da caspase-1 quando comparado ao grupo veículo (Veículo: $21,15 \pm 1,8$; LPS + Nigericina: $87,58 \pm 3,74$; Aldo: $32,71 \pm 3,34$; LPS + Aldo: $37,21 \pm 2,18$; $p < 0,05$). Macrófagos estimulados com aldosterona na presença de LPS apresentaram aumento da atividade de caspase-1, comparados ao grupo veículo (Figura 3).

Figura 3. Atividade da caspase-1 em macrófagos derivados da medula óssea estimulados com aldosterona. Imagens representativas do dot plot e gráfico representando a porcentagem da atividade da caspase-1 em cultura de macrófagos da medula óssea estimulados com LPS+NIG, aldosterona 10^{-7} M (Aldo) por 4 h ou Aldo 10^{-7} M após lipopolissacarídeo (LPS). O gráfico mostra a porcentagem da atividade da caspase-1. Os dados representam média $\pm$ E.P.M (n=3-5 por grupo). One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Veículo, (#) vs. LPS+Nig. Aldo: Aldosterona, LPS: Lipopolissacarídeo e NIG: Nigericina.

5.3. Efeito do tratamento com espironolactona sobre a glicemia e massa corporal nos grupos controle e diabético.

Animais tratados com veículo ou espironolactona foram monitorados durante as 6 semanas de tratamento para determinar o efeito do bloqueio de receptores mineralocorticoides sobre os valores de glicemia e massa corporal. Camundongos diabéticos db/db apresentaram maiores níveis de glicemia quando comparados aos camundongos do grupo controle (Controle: $156,1 \pm 5,7$ vs. db/db: $265,1 \pm 17,4$; $p < 0,05$) (Figuras 4A e 4B). A avaliação da glicemia durante o período de tratamento mostrou que camundongos diabéticos db/db tratados com espironolactona não apresentaram redução significativa nos níveis de glicose no sangue em comparação com camundongos db/db tratados com veículo até a sexta semana, quando os níveis glicêmicos foram significativamente menores em camundongos db/db tratados com espironolactona (Figura 4A). O efeito do tratamento com espironolactona na redução dos valores glicêmicos dos animais db/db após 6 semanas é evidenciado na Figura 4B (db/db veículo: $265,1 \pm 17,4$ vs. db/db espiro: $185,5 \pm 21,7$; $p < 0,05$). A massa corporal dos animais db/db foi maior que a observada em animais controle. O tratamento com espironolactona não alterou a massa corporal em camundongos do grupo controle ou db/db controle (Cont veículo: $29,2 \pm 0,5$; Cont espiro: $28,1 \pm 0,8$; db/db veículo: $55,2 \pm 1,0$; db/db espiro: $53,4 \pm 1,6$; $p < 0,05$) (Figura 4C).

O tratamento com espironolactona foi realizado na ração e, dessa forma, avaliamos o consumo de ração dos animais para determinar a ingesta por grupo e fazer possíveis ajustes da dose. O consumo foi avaliado em experimentos diferentes em caixas contendo entre 3-4 animais e cada gráfico representa o consumo em gramas por dia de um animal, calculado pela média do consumo total dividido pelo número de animais em cada caixa. Animais diabéticos veículo consumiram uma quantidade maior de ração, comparados ao grupo controle. O tratamento com espironolactona não alterou o consumo de ração do grupo controle ou diabético (Cont veículo: $3,32 \pm 0,12$; Cont espiro: $3,33 \pm 0,26$; db/db veículo: $5,49 \pm 0,42$; db/db espiro: $4,89 \pm 0,06$; $p < 0,05$) (Figura 4D). Esse conjunto de resultados evidencia a relação da aldosterona e do receptor MR com a hiperglicemia e/ou resistência à insulina no diabetes, uma vez que o tratamento com espironolactona reduz os níveis de glicemia em camundongos db/db.

Figura 4. Valores de massa corporal e glicemia em animais controle e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona. Os gráficos representam os níveis plasmáticos de glicose (A), níveis de glicemia no último dia tratamento (B), valores de massa corporal (em gramas) (C) e consumo de ração (D) de animais controle e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona (Espiro) por 6 semanas. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle veículo, (#) vs. db/db veículo. Espiro: espironolactona.

5.4. Efeito do tratamento com espironolactona na função de artérias mesentéricas de resistência dos grupos controle e diabético.

A função vascular foi avaliada em artérias mesentéricas de resistência de camundongos controle e db/db tratados com veículo ou espironolactona. Observamos que a resposta contrátil a PE foi similar entre os grupos controle e diabético (E_{max} : Cont veículo: $134,6 \pm 3,2$; Cont espiro: $138,6 \pm 7,1$; db/db veículo: $141,7 \pm 4,7$; db/db espiro: $126,1 \pm 5,7$; $p > 0,05$) (Figuras 5A e 6A). Apesar da resposta máxima ter sido igual entre os grupos, o tratamento com espironolactona reduziu a potência da PE nos grupos controle e diabético, comparados ao grupo controle tratado com veículo (Tabela 2). Na figura 5B observamos que o grupo diabético apresentou prejuízo na resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh) comparado ao grupo controle, e que o tratamento com espironolactona melhorou parcialmente o relaxamento nesse grupo (E_{max} : Cont veículo: $76,4 \pm 3,8$; Cont espiro: $75,3 \pm 4,5$; db/db veículo: $53,4 \pm 6,1$; db/db espiro: $63,3 \pm 5,9$; $p < 0,05$) (Figuras 5B e 6B). A Tabela 2 mostra os efeitos do tratamento com o antagonista do receptor MR, espironolactona, sobre os valores de pD_2 para a contração induzida por fenilefrina e para o relaxamento induzido por ACh em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético após 6 semanas de tratamento. Esse grupo de experimentos confirma que aldosterona contribui para a disfunção vascular observada nesse modelo experimental de diabetes, que apresenta níveis elevados de aldosterona.

Figura 5. Curvas concentração-efeito para PE e ACh em artérias mesentéricas de resistência de animais controle e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona. O gráfico representa curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A) e acetilcolina (ACh) (B) em artérias mesentéricas de

resistência de camundongos controle e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona (Espiro). Os resultados são apresentados como média $\pm$ E.P.M., (n=3-8). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle veículo, (#) vs. db/db veículo. Espiro: espironolactona.

Figura 6. Valores de Emax para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou espironolactona. A figura mostra os valores de Emax da PE (A) e ACh (B) em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou espironolactona por 6 semanas. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração máxima (n=3-8 por grupo). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle veículo.

Tabela 2. Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou espironolactona.

	Controle		db/db	
	pD_2 PE	pD_2 ACh	pD_2 PE	pD_2 ACh
Veículo	$6,7 \pm 0,06$	$7,2 \pm 0,15$	$6,6 \pm 0,08^{\&}$	$6,2 \pm 0,29^*$
	n=8	n=7	n=9	n=8
Espironolactona	$6,2 \pm 0,12^*$	$7,2 \pm 0,19$	$6,3 \pm 0,11$	$7,3 \pm 0,29$
	n=3	n=3	n=8	n=3

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle Veículo, (&) vs. Controle Espironolactona.

5.5. Efeito do tratamento com espironolactona na expressão de componentes do inflamassoma em artérias mesentéricas de camundongos controle e db/db.

Para avaliar se no diabetes ocorre ativação do inflamassoma, a expressão de caspase-1 e IL-1 β foi determinada por ensaios de western blotting em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético. A expressão da caspase-1 foi significativamente maior no grupo diabético quando comparado ao controle (Controle: $1,00 \pm 0,13$ vs. db/db: $3,02 \pm 0,39$; $p < 0,05$). O tratamento com espironolactona não alterou significativamente a expressão da caspase-1 nestes grupos (Controle veículo: $1,00 \pm 0,13$; controle espiro: $0,87 \pm 0,19$; db/db veículo: $3,02 \pm 0,39$; db/db espiro: $1,43 \pm 0,62$; $p < 0,05$) (Figura 7A). Avaliamos também a expressão das formas pró e ativa da citocina IL-1 β nas artérias mesentéricas dos grupos tratados com veículo e espironolactona. Artérias de animais db/db apresentaram maior expressão da forma ativa da citocina IL-1 β em relação ao grupo controle (Controle: $0,82 \pm 0,14$ vs. db/db: $2,25 \pm 0,48$; $p < 0,05$). O tratamento com espironolactona reduziu a expressão de IL-1 β em artérias mesentéricas de animais diabéticos (db/db veículo: $2,25 \pm 0,48$ vs. db/db espiro: $0,50 \pm 0,21$; $p < 0,05$) (Figura 7B).

Figura 7. Espironolactona reduz a expressão vascular de IL-1 β em camundongos db/db. Expressão de caspase-1 e de IL-1 β em artérias mesentéricas de resistência de animais controles e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona. Acima, imagens representativas de western blotting para caspase-1 (A) e IL-1 β (B) em artérias mesentéricas e, abaixo, os gráficos mostram a razão da expressão de pró-caspase-1/caspase-1 e da pró-IL-1 β /IL-1 β em função da expressão de (β -actina), usada como

normalizador. (n= 4-6/grupo). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle Veículo, (#) vs. db/db Veículo.

Os níveis plasmáticos da citocina IL-1 β foram determinados no soro dos grupos controle e diabético tratados com espironolactona ou veículo (Figura 8). Os valores circulantes da citocina IL-1 β no grupo diabético veículo não foram estatisticamente maiores quando comparados ao grupo controle veículo (Controle: $43,82 \pm 9,97$ vs. db/db: $80,47 \pm 25,29$; $p > 0,05$). Entretanto, o tratamento com espironolactona reduziu significativamente os níveis de IL-1 β no soro de animais db/db (db/db veículo: $80,47 \pm 25,29$ vs. db/db espiro: $11,62 \pm 3,18$; $p < 0,05$).

Figura 8. Níveis plasmáticos da citocina IL-1 β no soro de animais controle e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona. Os gráficos representam os níveis plasmáticos da citocina IL-1 β , determinados por ELISA, no soro de animais controle e diabético, tratados com veículo ou espironolactona. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (#) indica diferença significativa vs. db/db veículo.

A atividade da caspase-1 em macrófagos retirados do peritônio foi avaliada nos diferentes grupos experimentais - camundongos controle e diabéticos tratados com veículo ou espironolactona - para avaliar o efeito da ativação dos receptores MR em células do sistema imune. Quando avaliadas as células totais presente no lavado peritoneal, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Controle veículo: $43,63 \pm 9,95$; controle espiro: $29,64 \pm 2,81$; db/db veículo: $24,50 \pm 6,32$; db/db espiro: $33,10 \pm 7,18$; $p > 0,05$) (Figura 9A). Entretanto quando a atividade da caspase-1 foi determinada somente nos macrófagos do lavado peritoneal, observamos aumento da atividade da caspase-1 em macrófagos do lavado peritoneal em camundongos diabéticos tratados com veículo (Controle: $33,88 \pm 2,54$ vs. db/db: $51,75 \pm 7,43$;

$p < 0,05$) (Figura 9B). O tratamento de camundongos db/db com espironolactona, além de atenuar a ativação do inflamassoma nas artérias mesentéricas e diminuir as alterações vasculares no modelo de diabetes tipo 2, também reduziu a ativação do inflamassoma em macrófagos derivados do peritônio (Controle veículo: $33,88 \pm 2,54$; controle espiro: $31,11 \pm 1,98$; db/db veículo: $51,75 \pm 7,43$; db/db espiro: $34,76 \pm 3,81$; $p > 0,05$).

Esse conjunto de resultados evidencia que a aldosterona via ativação de MR contribui para as alterações glicêmicas, vasculares e inflamatórias observadas nesse modelo de diabetes tipo 2.

Figura 9. Atividade de caspase-1 em células totais e macrófagos do lavado peritoneal. Os gráficos mostram a porcentagem de caspase-1 ativa nas células totais (A) e em macrófagos (B) do lavado peritoneal provenientes de animais controle e diabéticos, tratados com veículo ou espironolactona. Atividade de caspase-1 foi determinada pelo método de FLYCA-FAM-YVAD. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle Veículo, (#) vs. db/db Veículo.

5.6. Efeito agudo do inibidor do receptor NLRP3 na função de artérias mesentéricas de resistência dos grupos controle e diabético.

Para determinar a participação dos receptores NLRP3 na reatividade vascular, utilizamos o inibidor de NLRP3, MCC950 (Coll *et al.*, 2015). A função vascular dos grupos controle e diabético foi avaliada em artérias mesentéricas de resistência incubadas por 1 hora com MCC950. Não foram observadas alterações na resposta contrátil máxima a PE entre os grupos controle e diabético, em presença de veículo ou MCC950 (Emax: Cont veículo: $153,8 \pm 5,3$; Cont MCC950: $142,5 \pm 4,3$; db/db veículo: $154,3 \pm 9,7$; db/db MCC950: $150,2 \pm 5,9$; $p > 0,05$). Entretanto, a presença de MCC950 deslocou para a direita a potência da resposta à PE no grupo controle (Figuras 10A e 11A). Em relação ao relaxamento dependente de endotélio induzido pela ACh, como já descrito, camundongos db/db apresentaram redução da resposta vasodilatadora, em presença de veículo, quando comparados ao grupo controle. O uso do inibidor de NLRP3 *in vitro* atenuou parcialmente o prejuízo da resposta vasodilatadora no grupo diabético (Emax: Cont veículo: $91,3 \pm 2,3$; Cont MCC950: $95,9 \pm 2,5$; db/db veículo: $44,1 \pm 3,2$; db/db MCC950: $71,9 \pm 4,5$; $p < 0,05$) (Figuras 10B e 11B). A Tabela 3 mostra os efeitos da incubação com MCC950 nos valores pD_2 da contração induzida por PE e na resposta vasodilatadora da ACh em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético.

Figura 10. Curvas concentração-efeito para PE e ACh em artérias mesentéricas de resistência de animais controle e diabéticos incubadas com veículo ou MCC950. O gráfico representa curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A) e acetilcolina (ACh) (B) em artérias mesentéricas de resistência de camundongos controle e diabéticos incubadas por 1 hora com veículo ou MCC950 (10^{-6} M). Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM, (n=3-10). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle veículo, (#) vs. db/db veículo.

Figura 11. Valores de Emax para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina dos grupos controle e diabético em artérias incubadas com veículo ou MCC950. A figura mostra os valores de Emax da PE (A) e ACh (B) em artérias mesentéricas de resistência dos grupos controle e diabético incubadas por 1 hora com veículo ou MCC950. Os dados representam a média ± E.P.M. dos valores de contração máxima. (n=3-10 por grupo). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle veículo, (#) vs. db/db veículo.

Tabela 3. Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético incubadas com veículo ou MCC950 por 1 hora.

	Controle		Diabético	
	pD_2 PE	pD_2 ACh	pD_2 PE	pD_2 ACh
Veículo	$6,6 \pm 0,08$	$7,3 \pm 0,07$	$6,7 \pm 0,15$	$6,7 \pm 0,19^*$
	n=6	n=10	n=6	n=10
MCC950	$6,1 \pm 0,06^{* \#}$	$7,1 \pm 0,07$	$6,7 \pm 0,09$	$7,1 \pm 0,18$
	n=6	n=6	n=3	n=4

Os dados representam a média ± E.P.M. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle veículo, (#) vs. db/db veículo.

5.7. Efeito do tratamento com inibidor do receptor NLRP3 sobre a massa corporal e glicemia em camundongos dos grupos controle e db/db.

Para determinar o efeito crônico do inibidor do receptor NLRP3 (MCC950) sobre as alterações vasculares observadas no diabetes tipo 2, MCC950 foi administrado por 14 dias aos camundongos dos grupos controle e diabético e os efeitos do tratamento sobre a massa corporal e os níveis glicêmicos foram avaliados.

Animais diabéticos db/db apresentaram maior massa corporal e maiores níveis glicêmicos quando comparados aos seus respectivos controles. Entretanto, o tratamento por duas semanas com MCC950 não alterou os valores da massa corporal (g: Cont veículo: $26,1 \pm 0,7$; Cont MCC950: $23,9 \pm 1,1$; db/db veículo: $51,0 \pm 2,3$; db/db MCC950: $48,2 \pm 0,6$; $p < 0,05$) (Figura 12A) ou reduziu a glicemia dos camundongos diabéticos (mg/dL: Cont veículo: $178,3 \pm 8,1$; Cont MCC950: $166,3 \pm 4,8$; db/db veículo: $402,0 \pm 36,1$; db/db MCC950: $317,8 \pm 36,5$; $p < 0,05$) (Figura 12B).

No teste oral de tolerância à glicose (Figura 12C), a glicemia basal T0 (antes da administração oral de glicose) não foi significativamente diferente entre os camundongos controle quando comparada à dos camundongos diabéticos. A área sob a curva da concentração de glicose sanguínea se mostrou diferente entre os grupos, com aumento significativo nos camundongos diabéticos comparados aos camundongos controle (Cont veículo: 325754 ± 19631 vs. db/db veículo: 566888 ± 71074). Entretanto, o tratamento com MCC950 não reduziu significativamente a tolerância à glicose dos animais diabéticos (Cont veículo: 325754 ± 19631 ; Cont MCC950: 297577 ± 36584 ; db/db veículo: 566888 ± 71074 ; db/db MCC950: 590157 ± 28154 ; $p < 0,05$) (Figura 12D).

Figura 12. MCC950 não altera a massa corporal e os valores glicêmicos de camundongos diabéticos. Massa corporal (A), glicemia (B) e teste oral de tolerância à glicose (C e D) em camundongos controle e db/db tratados com veículo ou MCC950 (10 mg/Kg/dia) por 2 semanas (n=3-7 animais por grupo). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle veículo, (#) vs. db/db veículo.

5.8. Efeito do tratamento com MCC950 na função de artérias mesentéricas de resistência dos grupos controle e diabético.

Após o tratamento com o inibidor do receptor NLRP3, MCC950, por 14 dias, as respostas contrátil e dilatadora de artérias dos grupos controle e diabético foram avaliadas. A contração induzida por PE foi semelhante entre os grupos controle e diabético, e o tratamento com o inibidor de NLRP3 não alterou essa resposta em nenhum dos grupos (Emax: Cont veículo: $137,6 \pm 6,6$; Cont MCC950: $146,7 \pm 6,1$; db/db veículo: $133,0 \pm 3,5$; db/db MCC950: $135,1 \pm 5,2$; $p > 0,05$) (Figuras 13A e 14A). A avaliação da resposta vasodilatadora induzida pela ACh evidenciou que o grupo diabético apresenta redução da vasodilatação à ACh, quando comparado ao grupo controle. O tratamento com MCC950 reverteu o prejuízo no relaxamento dependente de endotélio no grupo diabético (Emax: Cont veículo: $89,4 \pm 3,9$; Cont MCC950: $97,9 \pm 2,5$; db/db veículo: $52,1 \pm 4,9$; db/db MCC950: $83,5 \pm 4,0$; $p < 0,05$) (Figuras 13B e 14B). A Tabela 4 apresenta o efeito do tratamento por 14 dias com o inibidor do receptor NLRP3 sobre os valores de pD_2 da contração para PE e do relaxamento induzido por ACh em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético.

Figura 13. Curvas concentração-efeito para PE e ACh em artérias mesentéricas de resistência de animais controle e diabéticos tratados com veículo ou MCC950. O gráfico representa curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A) e acetilcolina (ACh) (B) em artérias mesentéricas de resistência de camundongos controle e diabéticos tratados com veículo ou MCC950 por 14 dias. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM, (n=3-8). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle veículo, (#) vs. db/db veículo.

Figura 14. Valores de $E_{\max}$ para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina nos grupos controle e diabético tratados com veículo ou MCC950. A figura mostra os valores de $E_{\max}$ para PE (A) e ACh (B) em artérias mesentéricas de camundongos dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou MCC950 por 2 semanas. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração máxima. (n=3-8 por grupo). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle Veículo, (#) vs. db/db veículo.

Tabela 4. Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou MCC950.

	Controle		Diabético	
	pD_2 PE	pD_2 ACh	pD_2 PE	pD_2 ACh
Veículo	$6,6 \pm 0,12$	$7,3 \pm 0,14$	$6,6 \pm 0,06$	$6,6 \pm 0,26$
	n=5	n=4	n=4	n=5
MCC950	$6,7 \pm 0,09$	$7,5 \pm 0,08^{\#}$	$6,5 \pm 0,09$	$7,2 \pm 0,14$
	n=3	n=3	n=5	n=5

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (#) indica diferença significativa vs. db/db veículo.

5.9. Efeito do tratamento com MCC950 sobre os componentes do inflamassoma e níveis de aldosterona em camundongos controle e db/db.

Para avaliar se o tratamento com o inibidor do receptor NLRP3 influencia a expressão dos componentes do inflamassoma, a expressão de caspase-1 e NLRP3 foi determinada, por ensaios de western blotting, em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético. Houve tendência a maior expressão de caspase-1 em artérias de camundongos db/db. Entretanto, a expressão não foi significativamente diferente entre os grupos controle e diabético (Cont veículo: $1,00 \pm 0,38$ vs. db/db veículo: $2,04 \pm 0,94$ $p > 0,05$) (Figura 15A). O tratamento com MCC950 não alterou significativamente a expressão da caspase-1 em nenhum dos grupos (Cont veículo: $1,00 \pm 0,38$; Cont MCC950: $0,68 \pm 0,10$; db/db veículo: $2,04 \pm 0,94$; db/db MCC950: $0,93 \pm 0,23$; $p > 0,05$) (Figura 15A). Avaliamos também a expressão do receptor NLRP3 em artérias mesentéricas dos grupos tratados com veículo e MCC950. A expressão de NLRP3 não foi diferente entre camundongos controle e db/db. O tratamento com o inibidor de NLRP3 também não afetou a expressão do receptor nos diferentes grupos (Cont veículo: $1,00 \pm 0,02$; Cont MCC950: $0,97 \pm 0,16$; db/db veículo: $0,79 \pm 0,15$; db/db MCC950: $0,60 \pm 0,11$; $p > 0,05$) (Figura 15B).

Figura 15. MCC950 não altera a expressão vascular de caspase-1 e NLRP3 em artérias de camundongos db/db. Expressão de caspase-1 e do receptor NLRP3 em artérias mesentéricas de resistência de animais controles e db/db tratados com veículo ou MCC950. Acima, imagens

representativas de western blotting para caspase-1 (A) e NLRP3 (B) em artérias mesentéricas e, abaixo, os gráficos mostram a razão da expressão de pró-caspase-1/caspase-1 e de NLRP3, em função da expressão de GAPDH, usado como normalizador. (n = 4-6/grupo). Two-way ANOVA com Bonferroni pós-teste, $p > 0,05$.

A expressão dos componentes do inflamassoma também foi avaliada no lavado peritoneal nos diferentes grupos experimentais, camundongos controle e diabéticos tratados com veículo ou MCC950. Não foi observado aumento da expressão da caspase-1 (Cont veículo: $1,00 \pm 0,19$; Cont MCC950: $1,21 \pm 0,52$; db/db veículo: $1,01 \pm 0,34$; db/db MCC950: $1,02 \pm 0,25$; $p > 0,05$) (Figura 16A) e de IL-1 β (Cont veículo: $0,87 \pm 0,36$; Cont MCC950: $0,87 \pm 0,39$; db/db veículo: $0,95 \pm 0,22$; db/db MCC950: $1,36 \pm 0,41$; $p > 0,05$) (Figura 16B) nas células do lavado peritoneal de camundongos diabéticos tratados com veículo quando comparados a seu respectivo controle. O tratamento com inibidor de NLRP3 não influenciou a expressão dos componentes do inflamassoma no lavado peritoneal de camundongos controle ou db/db.

Figura 16. Tratamento com o inibidor do receptor NLRP3 não altera a expressão de caspase-1 e IL-1 β no lavado peritoneal de camundongos controle e db/db. Expressão de caspase-1 e da citocina IL-1 β no lavado peritoneal de animais controles e db/db tratados com veículo ou MCC950. Acima, imagens representativas de western blotting para caspase-1 (A) e IL-1 β (B) em artérias mesentéricas e, abaixo, os gráficos mostram a razão da expressão de pró-caspase-1/caspase-1 e de pró-IL-1 β /IL-1 β , em função da expressão de GAPDH, usado como normalizador (n = 4-6/grupo). Two-way ANOVA com Bonferroni pós-teste, $p > 0,05$.

Avaliamos então se o tratamento com MCC950 altera os níveis plasmáticos de aldosterona e de IL-1 β nos grupos controle e diabético. Animais diabéticos também apresentaram níveis elevados de IL-1 β em relação ao grupo controle. O tratamento com o inibidor de NLRP3 reduziu os níveis dessa citocina no grupo diabético (Cont veículo: $2,0 \pm 2,1$; Cont MCC950: $0,0 \pm 0,1$; db/db veículo: $318,2 \pm 97,6$; db/db MCC950: $37,5 \pm 28,8$; $p < 0,05$) (Figura 17A). Animais diabéticos apresentaram maiores níveis plasmáticos de aldosterona quando comparados aos animais controle (Cont veículo: $222,0 \pm 29,3$ vs. db/db veículo: $552,7 \pm 85,4$; $p < 0,05$). O uso de MCC950 não alterou os níveis plasmáticos de aldosterona no grupo diabético (Cont veículo: $222,0 \pm 29,3$; Cont MCC950: $183,7 \pm 80,9$; db/db veículo: $552,7 \pm 85,4$; db/db MCC950: $434,2 \pm 73,8$; $p < 0,05$) (Figura 17B).

Figura 17. MCC950 diminui os níveis plasmáticos da citocina IL-1 β , mas não altera os níveis de aldosterona em camundongos db/db. Níveis plasmáticos da citocina IL-1 β (A) e de aldosterona (B) em camundongos controle e db/db tratados com veículo ou MCC950 por 2 semanas ($n=3-7$ animais por grupo). Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$ (*) indica diferença significativa vs. controle veículo; # vs. db/db veículo.

5.10. Correlação entre os níveis plasmáticos de aldosterona, citocina IL-1 β e glicemia nos grupos controle e diabético tratados com veículo e MCC950.

Para avaliar a relação entre aldosterona, diabetes e ativação do inflamassoma, foi determinada a correlação entre os níveis plasmáticos de aldosterona, citocina IL-1 β e glicêmicos em camundongos controle e db/db tratados com veículo ou MCC950. Foi observada correlação positiva entre os níveis plasmáticos de aldosterona e os valores glicêmicos nos animais avaliados ($r=0,7672$ e $p=0,0003$, Figura 18A). Os níveis de glicemia não se correlacionaram estatisticamente com os valores plasmáticos de IL-1 β ($r=0,4548$ e $p=0,0666$, Figura 18B). Também foi identificada correlação positiva entre os níveis plasmáticos de aldosterona e da citocina IL-1 β ($r=0,5168$ e $p=0,0337$, Figura 18C). Esse conjunto de resultados evidencia que o aumento de aldosterona apresenta correlação com os níveis glicêmicos e de citocina IL-1 β .

Figura 18. Correlação entre os níveis de aldosterona, IL-1 β e glicemia em camundongos controle e db/db tratados com veículo ou MCC950. A figura mostra a correlação entre os níveis de aldosterona e glicemia (A), IL-1 β e glicemia (B) e aldosterona e IL-1 β (C) no soro de camundongos controle e diabético tratados com veículo e MCC950 por 2 semanas. Cada ponto representa valores individuais. Correlação de Pearson.

5.11. Participação de receptores MR e NLRP3 na geração de espécies reativas de oxigênio em artérias de camundongos controle e db/db e em artérias estimuladas com aldosterona.

Artérias mesentéricas de camundongos db/db apresentaram aumento na geração do radical livre ânion superóxido, quando comparadas aos seus respectivos controles (Cont veículo: $0,87 \pm 0,21$ vs. db/db veículo: $1,90 \pm 0,28$ $p < 0,05$). A incubação aguda com o inibidor do receptor NLRP3 reverteu esse aumento na geração de ânion superóxido em artérias mesentéricas de resistência (Cont veículo: $0,87 \pm 0,21$; Cont MCC950: $0,52 \pm 0,18$; db/db veículo: $1,90 \pm 0,28$; db/db MCC950: $0,41 \pm 0,10$; $p < 0,05$) (Figura 19A). Não houve aumento significativo na geração do radical livre ânion superóxido em aortas de camundongos db/db incubadas com veículo ou MCC950 (Cont veículo: $1,00 \pm 0,18$; Cont MCC950: $2,31 \pm 0,63$; db/db veículo: $1,34 \pm 0,49$; db/db MCC950: $0,66 \pm 0,24$; $p > 0,05$) (Figura 19B).

Figura 19. MCC950 abole a geração de espécies reativas de oxigênio em artérias mesentéricas de camundongos db/db. A geração de ERO foi avaliada com lucigenina após 1 h de incubação com MCC950 (inibidor de NLRP3) ou veículo em artérias mesentéricas (A) e aorta (B) de camundongos controle e db/db (n= 3-5 por grupo). Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. Controle veículo, (#) vs. db/db veículo. URL: unidades relativas.

Artérias mesentéricas de camundongos controle foram estimuladas com aldosterona na presença de veículo, antagonista do receptor MR e do inibidor do receptor NLRP3 para avaliar a produção de ERO. Aldosterona não aumentou significativamente a geração do radical livre ânion superóxido, quando comparados ao veículo. Entretanto, a incubação prévia com o inibidor do receptor NLRP3 reduziu a geração de ERO quando comparada àquela em artérias incubadas somente com aldosterona (Veículo: $1,00 \pm 0,04$; Aldo: $1,37 \pm 0,20$; Espiro+Aldo: $0,83 \pm 0,18$; MCC950+Aldo: $0,59 \pm 0,13$; IL-1 β : $1,96 \pm 0,01$; $p < 0,05$) (Figura 20).

Figura 20. MCC950 reduz a geração de espécies reativas de oxigênio em artérias mesentéricas estimuladas com aldosterona. Os efeitos na geração de ERO foram avaliados por lucigenina após estimulação com aldosterona (Aldo- 10^{-7} 30 min), em artérias mesentéricas incubadas, por 1 h, com espironolactona (10^{-6} M) ou MCC950 (inibidor de NLRP3, 10^{-6} M) e IL-1 β (10 ng/mL- como controle positivo do inflamassoma) (n= 3-5 por grupo). One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (#) indica diferença significativa vs. aldosterona. URL: unidades relativas.

5.12. Níveis plasmáticos de aldosterona, IL-1 β e glicemia e correlação entre estas variáveis em voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2.

Para determinar possível correlação entre aldosterona e ativação do inflamassoma em humanos, os níveis plasmáticos de aldosterona e da citocina IL-1 β foram avaliados em voluntários saudáveis e em pacientes com diabetes tipo 2. Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de IL-1 β (Controle: $92,1 \pm 15,5$ vs. DM2: $127,0 \pm 23,6$ $p > 0,05$) (Figura 21A) e de aldosterona (Controle: $35,1 \pm 3,3$ vs. DM2: $42,3 \pm 8,5$ $p > 0,05$) (Figura 21B) entre os grupos controle e diabético. Entretanto, quando os pacientes diabéticos foram divididos de acordo com os níveis de aldosterona: <50 pg/mL ou >50 pg/mL (Controle: $35,1 \pm 3,3$; DM2 <50 : $28,7 \pm 4,0$; DM2 >50 : $78,7 \pm 15,9$; $p < 0,05$) (Figura 22A), pacientes com níveis de aldosterona >50 pg/mL apresentam maiores níveis de citocina IL-1 β (Controle: $92,1 \pm 15,5$; DM2 <50 : $81,3 \pm 21,2$; DM2 >50 : $170,6 \pm 29,9$; $p > 0,05$) (Figura 22B) e de glicemia (Controle: $92,9 \pm 5,4$; DM2 <50 : $144,5 \pm 13,6$; DM2 >50 : $185,9 \pm 52,2$; $p < 0,05$) (Figura 22C). As informações dos pacientes com diabetes tipo 2 e dos voluntários saudáveis estão apresentadas na Tabela 5.

Figura 21. Níveis plasmáticos de IL-1 β e aldosterona em voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2. Os gráficos representam os níveis plasmáticos da citocina IL-1 β (A) e de aldosterona (B), determinados por ELISA, em voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2. Os dados representam média $\pm$ E.P.M ($n=3-11$ por grupo). Teste-t, $p > 0,05$. DM2: pacientes com diabetes tipo 2.

Figura 22. Valores de aldosterona, IL-1 β e glicemia em pacientes com níveis variáveis de aldosterona. Pacientes com diabetes tipo 2 foram divididos de acordo com seus níveis plasmáticos de aldosterona (A). Níveis plasmáticos de citocina IL-1 β (B) e glicemia (C) nos grupos controle (voluntários saudáveis) e pacientes com diabetes tipo 2. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M (n=3-9 por grupo). One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. controle (voluntários saudáveis), (#) vs. Pacientes com níveis de aldosterona < 50 pg/mL. DM2: pacientes com diabetes tipo 2, < 50 : pacientes com níveis plasmáticos de aldosterona menores que 50 pg/mL, > 50 : pacientes com níveis plasmáticos de aldosterona maiores que 50 pg/mL.

Para avaliar a relação entre aldosterona, diabetes e ativação do inflamassoma foi determinada correlação entre os níveis plasmáticos de aldosterona, da citocina IL-1 β e glicêmicos em voluntários saudáveis (controle) e pacientes com diagnóstico de diabetes tipo 2. Não foram observadas correlação entre os níveis plasmáticos de aldosterona e da citocina IL-1 β ($r=0,4106$ e $p=0,2386$, Figura 23A), ou entre os níveis plasmáticos de aldosterona e os valores glicêmicos ($r=0,1658$ e $p=0,5547$, Figura 23B). Os níveis de glicemia também não se correlacionaram estatisticamente com os valores plasmáticos de IL-1 β ($r=0,1933$ e $p=0,5690$, Figura 23C).

Figura 23. Correlação entre os níveis de aldosterona, IL-1 β e glicemia em relação aos voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2. A figura mostra a correlação entre os níveis de aldosterona e IL-1 β (A), de aldosterona e glicemia (B) e IL-1 β e glicemia (C) nos grupos controle (voluntários saudáveis) e pacientes com diabetes tipo 2. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M (n=3-9 por grupo). Correlação de Pearson, $p>0,05$. DM2: pacientes com diabetes tipo 2, <50: pacientes com níveis plasmáticos de aldosterona menores que 50 pg/mL, >50: pacientes com níveis plasmáticos de aldosterona maiores que 50 pg/mL.

Tabela 5. Informações dos voluntários saudáveis e pacientes com diagnóstico de diabetes tipo 2.

	Voluntários Saudáveis	Pacientes com diabetes tipo 2
Idade (Anos)	41,2 $\pm$ 2,4 (n=6)	60 $\pm$ 2,1 (n=10)
HbAC (%)	-	9,1 $\pm$ 0,6
Sexo masculino/feminino	2/4	4/6

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M.

5.13. Expressão dos componentes do inflamassoma em voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo mellitus tipo 2.

A expressão da caspase-1 e IL-1 β foi avaliada no plasma de voluntários saudáveis e em pacientes com diabetes tipo 2. A expressão da pro-caspase-1 foi significativamente maior em pacientes com diabetes tipo 2 com níveis de aldosterona >50 pg/mL quando comparado a voluntários saudáveis (Controle: $0,74 \pm 0,23$; DM2<50: $1,01 \pm 0,27$; DM2>50: $2,16 \pm 0,21$; $p < 0,05$) (Figura 24A). A expressão da caspase-1 não foi estatisticamente diferente entre os grupos controle e diabético (Controle: $0,78 \pm 0,11$; DM2<50: $1,06 \pm 0,14$; DM2>50: $1,04 \pm 0,43$; $p > 0,05$) (Figura 24B).

Figura 24. Expressão de caspase-1 no plasma de voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2. No topo, imagens representativas do western blot para caspase-1. Na parte inferior, os gráficos mostram a razão de pro-caspase-1 (A) e de caspase-1 (B) em função do ponceau, usado como normalizador (n= 3-8/grupo). One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. controle (voluntários saudáveis). DM2: pacientes com diabetes tipo 2, <50: pacientes com níveis plasmáticos de aldosterona menores que 50 pg/mL, >50: pacientes com níveis plasmáticos de aldosterona maiores que 50 pg/mL.

A expressão da pro-IL-1 β foi significativamente maior em pacientes com diabetes tipo 2 com níveis de aldosterona >50 pg/mL quando comparado a voluntários saudáveis e pacientes com níveis menores que 50 pg/mL (Controle: $0,76 \pm 0,09$; DM2<50: $1,01 \pm 0,11$; DM2>50: $1,61 \pm 0,20$; $p < 0,05$) (Figura 25A). A expressão de IL-1 β foi maior entre os pacientes com

diabetes com níveis >50 pg/mL em relação ao grupo controle (Controle: $0,28 \pm 0,08$; DM2 <50 : $0,72 \pm 0,14$; DM2 >50 : $1,04 \pm 0,12$; $p < 0,05$) (Figura 25B).

Figura 25. Expressão de IL-1 β no plasma de voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2. No topo, imagens representativas do western blot para IL-1 β /pró-IL-1 β . Na parte inferior, os gráficos mostram a razão de pró-IL-1 β (A) e da citocina IL-1 β (B) em função do ponceau, usado como normalizador (n= 3-8/grupo). One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa vs. controle (voluntários saudáveis), (#) vs. Pacientes com níveis de aldosterona <50 pg/mL. DM2: pacientes com diabetes tipo 2, <50 : pacientes com níveis plasmáticos de aldosterona menores que 50 pg/mL, >50 : pacientes com níveis plasmáticos de aldosterona maiores que 50 pg/mL.

Esse conjunto de resultados reforça fortemente a associação entre os aumentos dos níveis de aldosterona e ativação do inflamassoma no diabetes e indica que NLRP3/inflamassoma pode desempenhar papel crucial nas anormalidades vasculares induzida pela aldosterona no diabetes.

6. DISCUSSÃO

Diferentes estudos evidenciam relação entre diabetes, disfunção vascular e aldosterona. A aldosterona é um importante hormônio que modula não somente o equilíbrio hidroeletrólítico, como também tem importante papel pró-inflamatório, pró-fibrótico e pró-oxidativo no sistema cardiovascular, contribuindo para as principais alterações vasculares e inflamatórias observadas no diabetes. Nosso conjunto de resultados sugere que a aldosterona, via receptores mineralocorticoides e ativação do inflamassoma NLRP3, contribui para a disfunção vascular no DM2.

Considerando avaliar a contribuição da aldosterona para as alterações vasculares no DM2, utilizamos camundongos db/db, linhagem de camundongos com alterações fenotípicas semelhantes as observadas em pacientes com DM2. Camundongos db/db apresentam níveis plasmáticos de aldosterona aumentados, bem como alterações vasculares funcionais e estruturais mediadas por aldosterona (Briones *et al.*, 2012; Silva, Bruder-Nascimento, *et al.*, 2015; Silva, Cau, *et al.*, 2015).

O presente estudo demonstra que a expressão de componentes da imunidade inata relacionados à ativação do inflamassoma, caspase-1 e citocina IL-1 β , estão aumentados em artérias mesentéricas de camundongos diabéticos e no plasma de pacientes com DM2. A aldosterona contribui para esse aumento, uma vez que o antagonismo de receptores MR reduz a expressão de caspase-1 e citocina IL-1 β nas artérias de camundongos db/db e melhora a função vascular. Nosso estudo também apresenta evidências que o receptor NLRP3 e os componentes do inflamassoma contribuem para a disfunção vascular induzida pela aldosterona no DM2.

Inicialmente, demonstramos que a aldosterona aumenta a expressão dos componentes do inflamassoma tanto em células de músculo liso vascular como em macrófagos. A aldosterona aumentou a atividade da caspase-1 em macrófagos, mas não em CMLV. Considerando que macrófagos são células do sistema imune especializadas em gerar resposta frente a sinais de injúria, é compreensível que a resposta à aldosterona tenha sido mais pronunciada nesse tipo celular. Entretanto, diferentes trabalhos, tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstram que aldosterona estimula a produção de citocinas, quimiocinas e aumento de mediadores inflamatórios por células da vasculatura. Nesse sentido, observamos aumento significativo da citocina IL-1 β em CMLV estimuladas com aldosterona, em presença de LPS, importante ativador do sistema imune.

Ao longo dos anos, foram demonstrados diferentes mecanismos pelos quais a aldosterona via MR contribui para alterações vasculares em doenças cardiovasculares e metabólicas, e como o uso dos principais antagonistas MR, como espironolactona e eplerenona, são benéficos para reduzir complicações associadas a essas doenças. Entre os principais mecanismos pelos quais a aldosterona, via ativação de MR, induz disfunção vascular podemos citar aumento da geração de ERO, aumento da fosforilação de MAP quinases como ERK1/2, desacoplamento e/ou redução da fosforilação da enzima eNOS, principal enzima produtora de óxido nítrico (Callera *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Ferreira, N. S. *et al.*, 2015; Silva, Bruder-Nascimento, *et al.*, 2015; Silva, Cau, *et al.*, 2015).

Corroborando dados da literatura, demonstramos que o tratamento com espironolactona por 6 semanas melhora a função vascular em animais diabéticos. Silva e colaboradores (Silva, Bruder-Nascimento, *et al.*, 2015) também encontraram melhora significativa da resposta vasodilatadora dependente de endotélio em artérias mesentéricas de camundongos db/db tratados com espironolactona. Entre os mecanismos relacionados à reversão da disfunção vascular podemos citar redução da produção de ERO, aumento de proteínas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e catalase, e aumento da subunidade β da guanilato ciclase solúvel, enzima alvo do óxido nítrico que induz geração de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e que ativa mecanismos relacionados ao relaxamento vascular (Brown, 2008; 2013).

No presente estudo, o tratamento com antagonista MR foi realizado adicionando-se espironolactona na ração dos animais. O tratamento modificou parâmetros vasculares de modo semelhante ao produzido pelo tratamento com antagonista MR administrado por gavagem (Silva, Bruder-Nascimento, *et al.*, 2015; Silva, Cau, *et al.*, 2015). Estes resultados permitem inferir que a administração de espironolactona na ração é eficaz, desde que sejam realizados ajustes da dose, e possivelmente é a melhor alternativa a ser adotada, uma vez que a espironolactona é de difícil diluição. De importância central, o tratamento farmacológico de pacientes com antagonistas MR, realizado por via oral, também é efetivo na melhora de parâmetros cardiovasculares (Pitt *et al.*, 1999; Pitt *et al.*, 2003).

Embora o tratamento com espironolactona não tenha alterado o relaxamento vascular a ACh no grupo controle, i.e. não foram observadas diferenças no relaxamento vascular a ACh entre os grupos controle veículo e controle tratado com espironolactona, o antagonista MR diminuiu a potência da fenilefrina para contração vascular nos animais controle e diabéticos quando comparados aos seus respectivos grupos tratados com veículo. Essa redução na potência pode estar relacionada a modulação que a aldosterona exerce, via receptor MR, em proteínas contráteis. Neste sentido, Ferreira e colaboradores demonstraram que aldosterona aumentou a

atividade da proteína ERK1/2 em artérias mesentéricas de camundongos db/db (Ferreira, N. S. *et al.*, 2015).

Nossos achados são consistentes com estudos que descreveram a influência da aldosterona na hiperglicemia e no comprometimento da sinalização da insulina (Hitomi *et al.*, 2007; Lastra-Lastra *et al.*, 2009; Luther e Brown, 2011; Sherajee *et al.*, 2012). De fato, o tratamento com espironolactona reduziu os níveis glicêmicos e melhorou a função vascular dos camundongos db/db. Entre os principais mecanismos pelos quais a aldosterona induz resistência à insulina, está a produção de espécies reativas de oxigênio (Lastra *et al.*, 2008; Luther *et al.*, 2012). A ativação de MR contribui pelo menos em parte para os efeitos da aldosterona na resistência à insulina, uma vez que o uso do antagonista MR espironolactona, além de reduzir a geração de ERO, aumenta a captação de glicose muscular induzida pela insulina (Lastra *et al.*, 2008). Em adipócitos, o uso de eplerenona melhora a sensibilidade à insulina, reduz inflamação e o estresse oxidativo (Hirata *et al.*, 2009). Além disso, a aldosterona induz degradação do substrato do receptor de insulina (Hitomi *et al.*, 2007; Sherajee *et al.*, 2012).

Apesar de vários estudos demonstrarem melhora na função vascular e no perfil glicêmico, não podemos descartar uma interdependência entre esses resultados, ou seja, que a melhora na função vascular pode representar efeito secundário à redução dos níveis de glicemia.

A contribuição da aldosterona para processos inflamatórios está relacionada à ativação de MR em células do sistema imune. Animais com deleção de MR em macrófagos são protegidos da fibrose cardíaca e aumento da pressão arterial induzidos pelo tratamento com DOCA-sal por 8 semanas. Além disso, a deficiência de MR em macrófagos promove efeitos semelhantes aos produzidos por antagonistas de MR, protegendo contra a hipertrofia cardíaca, fibrose e dano vascular causados por L-NAME e angiotensina II (Rickard *et al.*, 2009). Além disso, a deleção de MR reduz o fenótipo pró-inflamatório de macrófagos, diminui os níveis de TNF- α e de fatores relacionados ao processo fibrótico, em parte por mecanismos independentes de aldosterona (Usher *et al.*, 2010).

A fim de avaliar a relação entre a imunidade inata e o receptor mineralocorticoide no DM2, avaliamos os efeitos do tratamento com espironolactona sobre a expressão dos componentes do inflamassoma. Em nosso estudo, demonstramos que os animais diabéticos exibem aumento da expressão vascular de caspase-1 e IL-1 β , bem como aumento da atividade da caspase-1 em macrófagos do lavado peritoneal, quando comparados ao grupo controle. O tratamento com espironolactona é eficiente em reduzir a expressão vascular dos componentes do inflamassoma e a atividade da caspase-1. Além disso, camundongos db/db apresentam

aumento dos níveis plasmáticos da citocina IL-1 β , umas das principais citocinas pró-inflamatórias, quando comparados a animais controle. O tratamento com espironolactona por 6 semanas reduz os níveis plasmáticos dessa citocina.

O conjunto dessas evidências mostra a contribuição da aldosterona para a ativação do inflamassoma NLRP3 via ativação de MR. Considerando que o tratamento com espironolactona melhora a função vascular e reduz a expressão dos principais componentes associados à ativação da plataforma inflamassoma, podemos inferir que existe relação, possivelmente mediada pela aldosterona, entre os receptores NLRP3 e MR.

Dados recentes do nosso laboratório mostraram a participação do receptor NLRP3 nas alterações vasculares funcionais, estruturais e de perfil inflamatório induzidas pela aldosterona. Demonstramos que o receptor NLRP3 em células do sistema imune contribui para o prejuízo do relaxamento dependente de endotélio, aumento da resposta vascular contrátil, expressão de moléculas inflamatórias e adesão de macrófagos ao endotélio de aortas (Bruder-Nascimento *et al.*, 2016). Esses achados relacionam-se aos resultados obtidos no presente estudo, em que o uso do antagonista de receptores mineralocorticoides e do receptor NLRP3 melhora aspectos funcionais e parâmetros relacionados à ativação do inflamassoma em artérias de animais diabéticos que exibem aumento de aldosterona plasmática.

Com a finalidade de avaliar a contribuição direta do receptor NLRP3 para a disfunção vascular no diabetes, utilizamos um inibidor específico para esse receptor, MCC950 (Coll *et al.*, 2015). Os efeitos do MCC950 foram avaliados sobre a função vascular, níveis glicêmicos e marcadores inflamatórios no diabetes. O uso do inibidor do receptor NLRP3 *in vitro* melhorou parcialmente a disfunção vascular no grupo diabético. Entretanto, o tratamento *in vivo* com o antagonista do receptor NLRP3 melhorou o relaxamento dependente de endotélio e reduziu os níveis plasmáticos de IL-1 β , além de ter promovido tendência em diminuir a expressão dos componentes do inflamassoma, evidenciando que esse receptor está relacionado às alterações vasculares no diabetes.

O trabalho de Coll e colaboradores mostra os principais efeitos de MCC950, inibidor do receptor NLRP3. A molécula de MCC950 não bloqueia o efluxo de K⁺, o fluxo de Ca²⁺, ou a interação NLRP3–ASC. Essa molécula é eficiente em reduzir os níveis de IL-1 β e IL-6, sem alterar os níveis de TNF- α , em resposta a diferentes estímulos e em doenças associadas à ativação do receptor NLRP3 como, por exemplo, encefalomielite experimental autoimune e síndrome CAPSs Muckle–Wells, relacionada a uma mutação por ganho de função no receptor NLRP3. Dessa forma, foi sugerido que o receptor NLRP3, ou algum componente intimamente ligado à ativação de NLRP3, representa o alvo molecular do MCC950. Este estudo sugeriu

ainda que MCC950 poderia afetar algum evento crucial para a ativação de NLRP3, incluindo modificações pós-traducionais (Coll *et al.*, 2015).

A melhora na função vascular de camundongos diabéticos corrobora achados da literatura relacionando componentes do inflamassoma e aldosterona à lesões do sistema cardiovascular (Doi *et al.*, 2014; Bruder-Nascimento *et al.*, 2016; Krishnan *et al.*, 2016; Ling *et al.*, 2016). Esses estudos demonstraram que a ausência do receptor NLRP3, da proteína adaptadora ASC, da proteína caspase-1 e/ou do receptor de IL-1 β , via final da cascata de sinalização, previne o aumento da pressão arterial em modelos animais de hipertensão induzida por aldosterona, ou pelo seu análogo desoxicorticosterona, bem como reduz a expressão de marcadores e mediadores inflamatórios tanto na vasculatura, como nos rins e no coração. Adicionalmente, os tratamentos com inibidor do receptor NLRP3, com antagonista do receptor de IL-1 β e, mesmo com imunossuppressores, também são capazes de melhorar o quadro hipertensivo e reduzir a expressão de marcadores inflamatórios. Entre os mediadores cuja expressão é reduzida pelo tratamento com MCC950 estão TNF- α , OPN e IL-17A (Krishnan *et al.*, 2016). O tratamento com o imunossupressor mizoribina reduz a expressão renal de MCP-1, TNF- α , IFN- γ e IL-1 β , bem como expressão renal de caspase-1 e do receptor NLRP3, e promove ainda redução do infiltrado de linfócitos T e de macrófagos nos rins de animais tratados com aldosterona (Doi *et al.*, 2014). Entretanto, há estudo demonstrando que o antagonista do receptor de IL-1, anakinra, não altera o infiltrado inflamatório, apesar de diminuir parcialmente a expressão de alguns dos mediadores inflamatórios renais como MCP-1 e CCL5 (Ling *et al.*, 2016).

Considerando que o receptor NLRP3 já foi associado à indução da obesidade e resistência à insulina (Stienstra *et al.*, 2011; Vandanmagsar *et al.*, 2011), avaliamos quais seriam os efeitos do tratamento com o inibidor de NLRP3 sobre os valores glicêmicos e a tolerância à glicose em camundongos db/db. Nossos estudos mostraram queda significativa na glicemia somente na primeira semana de tratamento. A curva de tolerância à glicose também não foi diferente entre os grupos de camundongos diabéticos tratado com o inibidor de NLRP3 e veículo. Assim, o tratamento com MCC950 em nosso estudo não melhorou os níveis glicêmicos, nem a tolerância à glicose, em camundongos db/db.

Entretanto, estudo de Zhai e colaboradores demonstrou que o tratamento de camundongos db/db, por 8 semanas, com o inibidor do inflamassoma NLRP3 reduz os níveis glicêmicos e melhora a sensibilidade à insulina. A diferença entre os nossos achados e os do grupo de Zhai *et al.* pode ser decorrente do tempo de tratamento, uma vez que usamos o inibidor por somente 2 semanas, enquanto no estudo de Zhai o tratamento foi realizado por 8 semanas, tendo sido observada queda na glicemia somente na última semana (Zhai *et al.*, 2018). Apesar de não

observarmos diminuição nos níveis glicêmicos, a melhora no relaxamento vascular foi evidente em camundongos db/db. O grupo de Zhai et al. também observou redução dos comportamentos de ansiedade e depressão, bem como melhora da função cognitiva e redução da expressão dos componentes do inflamassoma no hipocampo.

Os níveis plasmáticos de aldosterona, elevados em humanos e modelos experimentais com diabetes, contribuem para o aumento de marcadores inflamatórios como TNF- α , MCP-1, TGF- β e IL-1 β (Guo *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006). Além disso, a aldosterona estimula fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o NF- κ B, que induz produção de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas, tais como pró-IL-1 β e pró-IL-18, que são convertidas nas suas formas maduras após a ativação do inflamassoma. Nossos resultados mostraram aumento nos níveis plasmáticos de aldosterona em camundongos db/db quando comparados ao grupo controle. Entretanto, o tratamento com MCC950 não reduziu os valores sanguíneos desse hormônio, indicando que o inibidor de NLRP3 não promove seus efeitos por interferir com os níveis de aldosterona.

A IL-1 β madura, produto final da ativação do inflamassoma, influencia diretamente a função vascular. A incubação de anéis aórticos de ratos espontaneamente hipertensos propensos a acidentes vasculares cerebrais (*stroke-prone spontaneously hypertensive rats*, SHRSP) durante 1 hora com IL-1 β aumenta significativamente a contratilidade arterial através da ativação de vias de sinalização da COX e Src-quinase (Dorrance, 2007). Além disso, a disfunção vascular em modelo experimental de diabetes tipo 1 está relacionada ao receptor de IL-1R, uma vez que o tratamento com anakinra (antagonista do receptor de IL-1) reduz a disfunção endotelial, o estresse oxidativo vascular e a inflamação (Vallejo *et al.*, 2014). Assim, em situações em que o processo inflamatório já está instalado, a ativação do inflamassoma parece contribuir ainda mais para as alterações vasculares.

A expressão dos componentes do inflamassoma também foi avaliada em artérias mesentéricas e no lavado peritoneal total de camundongos tratados com MCC950. Apesar do aumento evidente, mas não estatisticamente significativo, da caspase-1 em artérias mesentéricas de camundongos db/db, o tratamento com MCC950 mostrou tendência em reduzir essa expressão. Em relação a expressão do receptor NLRP3, não foi observada diferença entre artérias dos grupos controle e diabético tratados com veículo ou MCC950. A expressão de caspase-1 e da citocina IL-1 β não foi diferente entre células do lavado peritoneal de camundongos controle e db/db e o tratamento com o inibidor de NLRP3 também não influenciou a expressão de caspase-1 e IL-1 β . Comparando com grupo de resultados iniciais é clara que a expressão de caspase-1 tem tendência a ser maior no grupo diabético.

Em relação às células do lavado peritoneal, a atividade da caspase-1 foi maior em camundongos db/db, mas esse efeito é observado em macrófagos no primeiro grupo de experimentos. Nos experimentos em animais tratados com o inibidor do NLRP3, não foram observadas diferenças na atividade de caspase-1 entre os grupos controle e diabético tratados com veículo. Entretanto, deve-se levar em consideração que a análise foi realizada em células totais do lavado peritoneal e não somente em macrófagos. Isto pode ter influenciado o resultado, uma vez que no lavado peritoneal podem ser encontrados diferentes tipos celulares como macrófagos, linfócitos B e T (Ray e Dittel, 2010). A maioria dos macrófagos presentes no lavado peritoneal encontra-se no estado *naive*, ou seja, inativo. Camundongos diabéticos apresentam maior número de células totais no lavado peritoneal comparados ao controle. Em consequência disso, apresentam maior quantidade de macrófagos total. Quando os macrófagos são subdivididos de acordo com a classificação M1 e M2, o número de macrófagos M1 e M2 também é maior em camundongos db/db comparados ao grupo controle (dados não demonstrados). Considerando que foi feito o ajuste da atividade pelo número total de células, a presença de mais macrófagos ativados no peritônio de camundongos db/db pode ter contribuído para o aumento da atividade da caspase-1.

A ativação de macrófagos em camundongos db/db prejudica a cicatrização de feridas, aumenta os marcadores de inflamassoma e reduz a expressão de inibidores de inflamassoma endógeno, como PI-9 e caspase-12. Além disso, o transplante de células derivadas da medula óssea de camundongos nocaute para NLRP3 ou caspase-1 para camundongos db/db melhora a cicatrização de feridas e a participação de macrófagos no processo de cicatrização (Mirza *et al.*, 2014). A contribuição dos receptores da imunidade inata em células da medula óssea também é evidenciada na disfunção vascular induzida pela aldosterona. Animais quiméricos, ou seja, que apresentam o receptor NLRP3 em todo organismo, exceto na medula óssea, são resistentes/refratários à disfunção vascular e à resposta inflamatória induzidas pela aldosterona (Bruder-Nascimento *et al.*, 2016). Além disso, a ausência do receptor NLRP3 em outros tecidos que não o sistema imune também é capaz de prevenir os efeitos deletérios induzidos pela aldosterona (Ferreira, Bruder-Nascimento *et al.* – dados não publicados). Esses fatos revelam que receptores NLRP3, tanto no sistema imune como sistema vascular, contribuem para alterações vasculares induzidas pela aldosterona. A ativação de componentes do sistema imune inato na vasculatura e células imunes em animais diabéticos observada no presente estudo confirma participação do sistema imunológico em doenças cardiovasculares e metabólicas.

Um dos principais mecanismos que contribui para ativação do inflamassoma NLRP3, como segundo sinal, é a geração de ERO. Dessa maneira, avaliamos qual o efeito do inibidor

do receptor NLRP3 sobre o estresse oxidativo. Artérias mesentéricas de camundongos db/db apresentam maior produção de ERO quando comparadas a artérias de animais controle. O tratamento por 1 h com MCC950 reduz a produção de ânion superóxido em artérias mesentéricas, mas não em aorta, de camundongos diabéticos. A contribuição das ERO para o dano vascular no diabetes, assim como a participação da aldosterona nesse processo, é bem documentada (Callera *et al.*, 2005; Briet e Schiffrin, 2012; Bruder-Nascimento *et al.*, 2014; Silva, Bruder-Nascimento, *et al.*, 2015). Artérias mesentéricas apresentam diferenças estruturais e funcionais em relação à aorta e deve-se considerar que a maioria das alterações observadas nesse estudo foram registradas em artérias mesentéricas, o que poderia, em parte, justificar os resultados discrepantes observados nas aortas.

Kadoya e colaboradores demonstraram que a aldosterona induz lesão renal e aumento da produção de ERO derivadas da mitocôndria, além de aumento da atividade de caspase-1 e da citocina IL-18 em linhagem celular de macrófagos. Esses efeitos são em parte mediados por MR, uma vez que o uso de eplerenona reduz a geração de ERO mitocondrial e a atividade da caspase (Kadoya *et al.*, 2015). Em macrófagos derivados da medula óssea também é demonstrado aumento do estresse oxidativo e da atividade de caspase-1, o que não é observado em animais nocautes para NLRP3 (Bruder-Nascimento *et al.*, 2016).

Esse conjunto de resultados em animais tratados com MCC950 mostra claramente a participação do receptor NLRP3 na disfunção vascular em camundongos db/db e revela mecanismos que poderiam estar envolvidos como, por exemplo, o aumento da produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e maior geração de espécies reativas de oxigênio. Os resultados sugerem, ainda, que o receptor NLRP3 não altera os níveis glicêmicos ou os valores plasmáticos de aldosterona.

No intuito de tornar nossa pesquisa translacional e associar os resultados com o que se observa no diabetes mellitus tipo 2 em humanos, para o aprimoramento das informações acerca dessa doença, nós avaliamos a possível correlação entre aldosterona e ativação do inflamassoma em pacientes diabéticos. Os níveis plasmáticos de aldosterona e da citocina IL-1 β foram avaliados em voluntários saudáveis e em pacientes com diabetes tipo 2. Pacientes com diabetes mellitus tipo 2 apresentam valores de glicemia maiores que os observados em voluntários saudáveis. Ao avaliarmos os níveis plasmáticos de aldosterona e da citocina IL-1 β não encontramos diferenças significativas entre os pacientes com diabetes tipo 2 e voluntários saudáveis. Entretanto, após subdivisão dos pacientes diabéticos de acordo com os níveis de aldosterona, observamos que pacientes com maiores níveis de aldosterona apresentam maiores níveis de glicemia e de IL-1 β .

Não observamos diferença significativa entre os níveis plasmáticos de aldosterona e de IL-1 β entre voluntários saudáveis e pacientes com diabetes. Após subdivisão dos pacientes com diabetes de acordo com os níveis de aldosterona, pacientes com maiores níveis de aldosterona apresentaram maiores níveis glicêmicos e de citocina pró-inflamatória. Nossos resultados não reproduziram dados da literatura demonstrando que pacientes com DM1 (Hollenberg *et al.*, 2004) e DM2 (Price *et al.*, 1999) apresentam maiores níveis plasmáticos de aldosterona.

Pacientes com adenomas produtores de aldosterona e submetidos a adrenalectomia apresentam aumento na secreção de insulina após a cirurgia, indicando que o excesso de aldosterona inibe a secreção de insulina (Catena *et al.*, 2006; Tsurutani *et al.*, 2017), evidenciando, assim, a associação entre diabetes mellitus e aldosterona. Em pacientes com hipertensão arterial, foi demonstrada relação direta entre aldosterona, resistência à insulina e hiperinsulinemia (Colussi *et al.*, 2007). Correlação positiva entre os níveis de aldosterona e resistência à insulina também foi observada em pacientes com insuficiência cardíaca, o que poderia contribuir para a manutenção de maiores níveis da pressão arterial e para o aumento de complicações vasculares nestes pacientes (Freel *et al.*, 2009). Os níveis de aldosterona correlacionam-se positivamente com expressão de moléculas inflamatórias como ICAM-1, proteína inibidora tecidual da metaloproteinase-1, marcador sérico de degradação do colágeno, e marcador de estresse oxidativo 8-iso-PGF2a em pacientes com insuficiência cardíaca (Kotlyar *et al.*, 2006), reforçando associação do aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona com estresse oxidativo, inflamação e remodelamento.

Em nosso estudo não conseguimos detectar correlação significativa entre os níveis de aldosterona, glicemia e IL-1 β . Entretanto, algumas limitações podem ter afetado esse resultado. Entre elas, podemos citar o número amostral, a variação entre o estágio de progressão da doença, além de parâmetros importantes a serem considerados como idade, massa corporal, índice de massa corporal, sexo, cor da pele, níveis de renina, presença de lesão renal e principalmente os diferentes tratamentos farmacológicos a quais os pacientes estavam submetidos para o tratamento do diabetes mellitus e outras comorbidades.

Pacientes recém diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 apresentam maior expressão dos componentes do inflamassoma NLRP3, ASC e maiores níveis de IL-1 β , IL-18, IL-6 e MCP-1 em macrófagos derivados de monócitos quando comparados a voluntários saudáveis. Após 2 meses de tratamento com metformina, há redução da expressão de IL-1 β , induzida por ativadores do inflamassoma, em macrófagos (Lee *et al.*, 2013). Ensaios clínicos utilizando anakinra, antagonista do receptor para IL-1 β , produto final da ativação do inflamassoma, em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, durante treze semanas, demonstraram redução dos níveis

glicêmicos, melhora na função secretora das células beta e redução de marcadores inflamatórios, como proteína C reativa e IL-6 (Larsen *et al.*, 2007).

O tratamento com anakinra não aumentou significativamente a incidência de doença infecciosa, não induziu quadros de hipoglicemia ou efeitos adversos graves, sendo considerando um importante alvo terapêutico para tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Levando em consideração os efeitos benéficos associados ao uso de antagonista de receptores mineralocorticoides em pacientes e animais diabéticos e ao uso do inibidor do receptor NLRP3 em camundongos com diabetes mellitus tipo 2, demonstrados nesse trabalho, é possível considerar que esses seriam importantes alvos terapêuticos no tratamento do diabetes mellitus.

O conjunto de evidências acima confirma que o diabetes é uma importante doença associada à ativação do inflamassoma e que a aldosterona é um importante ativador de NLRP3, levando à disfunção vascular e alterações cardiovasculares e renais. A nossa hipótese foi confirmada uma vez que demonstramos que, de forma direta, a aldosterona leva à ativação do inflamassoma e contribui para as alterações inflamatórias e vasculares no DM2. O uso de espironolactona, antagonista MR, e de MCC950, inibidor do receptor NLRP3, melhora a função vascular de camundongos db/db, reduz a expressão de IL-1 β e diminui a expressão e a ativação de caspase-1 e IL-1 β vascular. O uso de MCC950 ainda é eficaz em inibir a produção de ERO, o que poderia contribuir para a melhora da função vascular. Além disso, demonstramos correlação entre os níveis de IL-1 β , aldosterona e glicose em animais diabéticos. Pacientes com diabéticos mellitus tipo 2 com maiores níveis plasmáticos de aldosterona também apresentam maiores níveis glicêmicos e maior expressão de marcadores inflamatórios.

Em conclusão, nosso estudo mostra que a aldosterona induz disfunção vascular no diabetes tipo 2 através da ativação do receptor MR e do inflamassoma NLRP3, o que aumenta os processos de sinalização associados à inflamação e à disfunção vascular. Os resultados contribuem para a compreensão dos mecanismos da imunidade inata na disfunção vascular associada à patologia do diabetes, os quais podem ser especialmente importantes em condições associadas ao aumento dos níveis de aldosterona, como obesidade, síndrome metabólica e hipertensão arterial.

7. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados deste estudo indica que os receptores mineralocorticoides e NLRP3 contribuem para a disfunção vascular e para a ativação de mediadores inflamatórios no modelo experimental de diabetes tipo 2 e pacientes com diabetes mellitus tipo 2. A aldosterona estimula a ativação do inflamassoma, podendo amplificar um sinal primário em células de músculo liso vascular. Em macrófagos, células do sistema imune que contribuem para processos inflamatórios na vasculatura de animais diabéticos, o estímulo com aldosterona é capaz de aumentar a atividade de caspase-1. Adicionalmente, evidencia que o receptor NLRP3 pode influenciar as alterações vasculares, o processo inflamatório e estresse oxidativo em animais diabéticos.

Em conclusão, nosso estudo mostra que a aldosterona induz disfunção vascular no diabetes mellitus tipo 2 através da ativação de MR e do inflamassoma NLRP3, o que aumenta os processos de sinalização associados à inflamação, estresse oxidativo e disfunção vascular. Isso abre perspectivas promissoras para a compreensão dos mecanismos da imunidade inata na disfunção vascular associada à patologia do diabetes e pode ser especialmente importante em condições associadas ao aumento dos níveis de aldosterona, como obesidade, síndrome metabólica, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca.

Figura 26. Esquema geral relacionando a disfunção vascular às ações da aldosterona mediadas por MR e NLRP3 no diabetes mellitus tipo 2. Aldosterona aumenta a produção de mediadores inflamatórios, aumenta os níveis de IL-1β e a geração de ERO que contribuem para a disfunção vascular e inflamação no diabetes. O uso de espironolactona, antagonista mineralocorticoide, e de MCC950, inibidor do receptor NLRP3, atenua a disfunção vascular induzida pela aldosterona.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.D.A. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Peripheral arterial disease in people with diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 12, p. 3333-41, Dec 2003.

_____. Standards of medical care in diabetes--2013. **Diabetes Care**, v. 36 Suppl 1, p. S11-66, Jan 2013.

AMADOR, C. A. et al. Spironolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes. **Hypertension**, v. 63, n. 4, p. 797-803, Apr 2014.

BECKMAN, J. A. et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. **Eur Heart J**, v. 34, n. 31, p. 2444-52, Aug 2013.

BLASI, E. R. et al. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. **Kidney Int**, v. 63, n. 5, p. 1791-800, May 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRASIL. Diabetes Mellitus - Cadernos de Atenção Básica, n. 16. **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica - Brasília: Ministério da Saúde.**, v. Série A. Normas e Manuais Técnicos, p. 64, 2006.

BRIET, M.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular Actions of Aldosterone. **J Vasc Res**, v. 50, n. 2, p. 89-99, Nov 21 2012.

BRILLA, C. G.; MATSUBARA, L. S.; WEBER, K. T. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. **J Mol Cell Cardiol**, v. 25, n. 5, p. 563-75, May 1993.

BRILLA, C. G. et al. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. **Circ Res**, v. 67, n. 6, p. 1355-64, Dec 1990.

BRIONES, A. M. et al. Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. **Hypertension**, v. 59, n. 5, p. 1069-78, May 2012.

BROWN, N. J. Aldosterone and vascular inflammation. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 161-7, Feb 2008.

_____. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. **Nat Rev Nephrol**, v. 9, n. 8, p. 459-69, Aug 2013.

BRUDER-NASCIMENTO, T.; DA SILVA, M. A.; TOSTES, R. C. The involvement of aldosterone on vascular insulin resistance: implications in obesity and type 2 diabetes. **Diabetol Metab Syndr**, v. 6, n. 1, p. 90, 2014.

BRUDER-NASCIMENTO, T. et al. NLRP3 Inflammasome Mediates Aldosterone-Induced Vascular Damage. **Circulation**, Nov 1 2016.

CALLERA, G. E. et al. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. **Hypertension**, v. 45, n. 4, p. 773-9, Apr 2005.

CATENA, C. et al. Insulin sensitivity in patients with primary aldosteronism: a follow-up study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 9, p. 3457-63, Sep 2006.

CHIGNALIA, A. Z. et al. Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src-dependent pathways. **Hypertension**, v. 59, n. 6, p. 1263-71, Jun 2012.

COLL, R. C. et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. **Nat Med**, v. 21, n. 3, p. 248-55, Mar 2015.

COLUSSI, G. et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia are related to plasma aldosterone levels in hypertensive patients. **Diabetes Care**, v. 30, n. 9, p. 2349-54, Sep 2007.

COOPER, S. A. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 4, p. H2009-23, Oct 2007.

DAVIES, J. et al. Spironolactone reduces brachial pulse wave velocity and PIIINP levels in hypertensive diabetic patients. **Br J Clin Pharmacol**, v. 59, n. 5, p. 520-3, May 2005.

DAVIES, J.; STRUTHERS, A. The potential benefits of aldosterone antagonism in Type 2 diabetes mellitus. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 3, n. 3, p. 150-5, Sep 2002.

DE VRIESE, A. S. et al. Endothelial dysfunction in diabetes. **Br J Pharmacol**, v. 130, n. 5, p. 963-74, Jul 2000.

DOI, T. et al. Mizoribine ameliorates renal injury and hypertension along with the attenuation of renal caspase-1 expression in aldosterone-salt-treated rats. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93513, 2014.

DORRANCE, A. M. Interleukin 1-beta (IL-1beta) enhances contractile responses in endothelium-denuded aorta from hypertensive, but not normotensive, rats. **Vascul Pharmacol**, v. 47, n. 2-3, p. 160-5, Aug-Sep 2007.

FERREIRA, N. S. et al. Diabetes impairs the vascular effects of aldosterone mediated by G protein-coupled estrogen receptor activation. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 34, 2015.

FERREIRA, N. S. et al. Diabetes impairs the vascular effects of aldosterone mediated by G protein-coupled estrogen receptor activation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 2015-March-2 2015.

FREEL, E. M. et al. Aldosterone status associated with insulin resistance in patients with heart failure--data from the ALOFT study. **Heart**, v. 95, n. 23, p. 1920-4, Dec 2009.

GLOIRE, G.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 11, p. 1493-505, Nov 30 2006.

GOREN, I. et al. Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2821-32, Nov 2003.

GROS, R. et al. Aldosterone Mediates Its Rapid Effects in Vascular Endothelial Cells through Gper/Gpr30 Activation. **Am J Physiol Cell Physiol**, Jan 2 2013.

GROS, R. et al. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 442-51, Mar 2011.

GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, v. 320, n. 6061, p. 454-6, Apr 3-9 1986.

GUARIGUATA, L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 98, n. 3, p. 524-5, Dec 2012.

GUO, C. et al. Mineralocorticoid receptor antagonist reduces renal injury in rodent models of types 1 and 2 diabetes mellitus. **Endocrinology**, v. 147, n. 11, p. 5363-73, Nov 2006.

GUO, C. et al. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. **Circulation**, v. 117, n. 17, p. 2253-61, Apr 29 2008.

GUO, Z. et al. COX-2 up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperreactivity in spontaneous diabetic db/db mice. **Cardiovasc Res**, v. 67, n. 4, p. 723-35, Sep 1 2005.

GUZIK, T. J. et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. **J Exp Med**, v. 204, n. 10, p. 2449-60, Oct 01 2007.

HERRADA, A. A. et al. Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. **J Immunol**, v. 184, n. 1, p. 191-202, Jan 1 2010.

HILE, C.; VEVES, A. Diabetic neuropathy and microcirculation. **Curr Diab Rep**, v. 3, n. 6, p. 446-51, Dec 2003.

HIRATA, A. et al. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. **Cardiovasc Res**, v. 84, n. 1, p. 164-72, Oct 1 2009.

HITOMI, H. et al. Aldosterone suppresses insulin signaling via the downregulation of insulin receptor substrate-1 in vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 750-5, Oct 2007.

HOLLENBERG, N. K. et al. Plasma aldosterone concentration in the patient with diabetes mellitus. **Kidney Int**, v. 65, n. 4, p. 1435-9, Apr 2004.

HUYSMAN, E.; MATHIEU, C. Diabetes and peripheral vascular disease. **Acta Chir Belg**, v. 109, n. 5, p. 587-94, Oct 2009.

I.D.F. International Diabetes Federation - Diabetes Atlas. v. 5th Edition, 2012.

_____. International Diabetes Federation - Diabetes Atlas. **6th Edition**, 2013.

_____. International Diabetes Federation - Diabetes Atlas. v. 8th edition, 2017.

JAFFE, I. Z.; MENDELSON, M. E. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 96, n. 6, p. 643-50, Apr 1 2005.

JOHAR, S. et al. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. **FASEB J**, v. 20, n. 9, p. 1546-8, Jul 2006.

KADOYA, H. et al. Excess aldosterone is a critical danger signal for inflammasome activation in the development of renal fibrosis in mice. **FASEB J**, v. 29, n. 9, p. 3899-910, Sep 2015.

KASAL, D. A. et al. T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 324-30, Feb 2012.

KOTLYAR, E. et al. The relationship between aldosterone, oxidative stress, and inflammation in chronic, stable human heart failure. **J Card Fail**, v. 12, n. 2, p. 122-7, Mar 2006.

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

KUMAGAI, E. et al. Plasma aldosterone levels and development of insulin resistance: prospective study in a general population. **Hypertension**, v. 58, n. 3, p. 1043-48, Nov 2011.

LARSEN, C. M. et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 356, n. 15, p. 1517-26, Apr 12 2007.

LASTRA-LASTRA, G. et al. Role of aldosterone and angiotensin II in insulin resistance: an update. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 71, n. 1, p. 1-6, Jul 2009.

LASTRA, G. et al. Low-dose spironolactone reduces reactive oxygen species generation and improves insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle in the TG(mRen2)27 rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 1, p. E110-6, Jul 2008.

LEE, H. et al. Upregulated NLRP3 Inflammasome Activation in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 62, Jan 2013.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 10, p. 725-34, Oct 2002.

LING, Y. H. et al. Anakinra reduces blood pressure and renal fibrosis in one kidney/DOCA/salt-induced hypertension. **Pharmacol Res**, Dec 13 2016.

- LOMBES, M. Various actions of aldosterone: the kidney and beyond. **Ann Endocrinol (Paris)**, v. 70, n. 3, p. 173-5, Jun 2009.
- LUTHER, J. M.; BROWN, N. J. The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, n. 12, p. 734-9, Dec 2011.
- LUTHER, J. M. et al. Aldosterone deficiency and mineralocorticoid receptor antagonism prevent angiotensin II-induced cardiac, renal, and vascular injury. **Kidney Int**, v. 82, n. 6, p. 643-51, Sep 2012.
- MACKENZIE, S. M. et al. Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. **J Mol Endocrinol**, v. 24, n. 3, p. 321-8, Jun 2000.
- MANRIQUE, C. et al. The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. **Med Clin North Am**, v. 93, n. 3, p. 569-82, May 2009.
- MARTINON, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 616-9, Mar 2010.
- MCFARLANE, S. I.; SOWERS, J. R. Cardiovascular endocrinology 1: aldosterone function in diabetes mellitus: effects on cardiovascular and renal disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 2, p. 516-23, Feb 2003.
- MIRZA, R. E. et al. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 1103-14, Mar 2014.
- MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ Res**, v. 41, n. 1, p. 19-26, Jul 1977.
- OELZE, M.; SCHUHMACHER, S.; DAIBER, A. Organic nitrates and nitrate resistance in diabetes: the role of vascular dysfunction and oxidative stress with emphasis on antioxidant properties of pentaerithrityl tetranitrate. **Exp Diabetes Res**, v. 2010, p. 213176, 2010.
- PANENI, F. et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. **Eur Heart J**, v. 34, n. 31, p. 2436-43, Aug 2013.
- PITT, B. et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 348, n. 14, p. 1309-21, Apr 3 2003.
- PITT, B. et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. **N Engl J Med**, v. 341, n. 10, p. 709-17, Sep 2 1999.
- PRICE, D. A. et al. The state and responsiveness of the renin-angiotensin-aldosterone system in patients with type II diabetes mellitus. **Am J Hypertens**, v. 12, n. 4 Pt 1, p. 348-55, Apr 1999.

- QUEISSER, N.; SCHUPP, N. Aldosterone, oxidative stress, and NF-kappaB activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 2, p. 314-27, Jul 15 2012.
- RAY, A.; DITTEL, B. N. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. **J Vis Exp**, n. 35, Jan 28 2010.
- RICKARD, A. J. et al. Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. **Hypertension**, v. 54, n. 3, p. 537-43, Sep 2009.
- ROCHA, R. et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 283, n. 5, p. H1802-10, Nov 2002.
- SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. **Clin Sci (Lond)**, v. 112, n. 7, p. 375-84, Jun 2007.
- SCHIFFRIN, E. L. Effects of aldosterone on the vasculature. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 312-8, Mar 2006.
- SCHNEIDER, J. G. et al. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. **Am J Hypertens**, v. 15, n. 11, p. 967-72, Nov 2002.
- SCHRECK, R.; RIEBER, P.; BAEUERLE, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. **EMBO J**, v. 10, n. 8, p. 2247-58, Aug 1991.
- SHERAJEE, S. J. et al. Aldosterone induces vascular insulin resistance by increasing insulin-like growth factor-1 receptor and hybrid receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 2, p. 257-63, Feb 2012.
- SILVA, M. A. et al. Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling. **Front Physiol**, v. 6, p. 269, 2015.
- SILVA, M. A. et al. Mineralocorticoid receptor blockade prevents vascular remodelling in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. **Clin Sci (Lond)**, v. 129, n. 7, p. 533-45, Oct 2015.
- STAS, S. et al. Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling. **Endocrinology**, v. 148, n. 8, p. 3773-80, Aug 2007.
- STIENSTRA, R. et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 37, p. 15324-9, Sep 13 2011.
- STROMSTEDT, M.; WATERMAN, M. R. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 34, n. 1, p. 75-88, Dec 1 1995.

SUN, Y. et al. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. **Am J Pathol**, v. 161, n. 5, p. 1773-81, Nov 2002.

SWAMINATHAN, K. et al. Spironolactone for poorly controlled hypertension in type 2 diabetes: conflicting effects on blood pressure, endothelial function, glycaemic control and hormonal profiles. **Diabetologia**, v. 51, n. 5, p. 762-8, May 2008.

TAIT, J. F.; SIMPSON, S. A.; GRUNDY, H. M. The effect of adrenal extract on mineral metabolism. **Lancet**, v. 1, n. 6699, p. 122-4, Jan 19 1952.

TAKEDA, Y. et al. Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 8, p. 2797-800, Aug 1996.

TAKEDA, Y. et al. Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. **Hypertension**, v. 25, n. 2, p. 170-3, Feb 1995.

TERADA, Y. et al. Aldosterone stimulates nuclear factor-kappa B activity and transcription of intercellular adhesion molecule-1 and connective tissue growth factor in rat mesangial cells via serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase-1. **Clin Exp Nephrol**, v. 16, n. 1, p. 81-8, Feb 2012.

TOSTES, R. C. et al. Contribution of endothelin-1 to renal activator protein-1 activation and macrophage infiltration in aldosterone-induced hypertension. **Clin Sci (Lond)**, v. 103 Suppl 48, p. 25S-30S, Aug 2002.

TSCHOPP, J. Mitochondria: Sovereign of inflammation? **Eur J Immunol**, v. 41, n. 5, p. 1196-202, May 2011.

TSURUTANI, Y. et al. Aldosterone excess may inhibit insulin secretion: A comparative study on glucose metabolism pre- and post-adrenalectomy in patients with primary aldosteronism. **Endocr J**, v. 64, n. 3, p. 339-346, Mar 31 2017.

USHER, M. G. et al. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 9, p. 3350-64, Sep 2010.

VALLEJO, S. et al. The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol**, v. 13, p. 158, 2014.

VANDANMAGSAR, B. et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nat Med**, v. 17, n. 2, p. 179-88, Feb 2011.

WENCESLAU, C. F. et al. Mitochondrial damage-associated molecular patterns and vascular function. **Eur Heart J**, Feb 25 2014.

WHITING, D. R. et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 94, n. 3, p. 311-21, Dec 2011.

WHO. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. **WHO Document Production Services**, v. World Health organization / International Diabetes Federation, 2006.

_____. Prevention and Control of Noncommunicable Diseases: Guidelines for Primary Health Care in Low Resource Settings. **World Health organization - WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee.**, Care in Low Resource Settings 2012.

_____. Global report on diabetes. **World Health organization - WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee.**, 2016. ISSN 978 92 4 156525 7.

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

YE, P. et al. The aldosterone synthase (CYP11B2) and 11beta-hydroxylase (CYP11B1) genes are not expressed in the rat heart. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5287-93, Dec 2005.

ZHAI, Y. et al. Inhibiting the NLRP3 Inflammasome Activation with MCC950 Ameliorates Diabetic Encephalopathy in db/db Mice. **Molecules**, v. 23, n. 3, Feb 27 2018.

ZHUANG, Y. et al. NLRP3 inflammasome mediates albumin-induced renal tubular injury through impaired mitochondrial function. **J Biol Chem**, v. 289, n. 36, p. 25101-11, Sep 5 2014.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeito do tratamento com espirolactona na produção de DAMPS mitocondriais para ativação do inflamassoma no diabetes Mellitus tipo 2*”, registrado com o número **080/2015**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 02 de agosto de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 50 camundongos C57BLKS/Jlepr db/db machos pesando 30g, 50 camundongos C57BLKS/Jlepr db/+ machos pesando 30g, 50 camundongos C57BLKS/Jlepr db/db fêmeas pesando 30g e 50 camundongos C57BLKS/Jlepr db/+ fêmeas pesando 30g, oriundos do Biotério de Manutenção do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 50 camundongos Nalp3 KO machos pesando 20g, 50 camundongos Caspase-1 KO machos pesando 20g e 50 camundongos ASC KO machos pesando 20g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 50 camundongos NLRP1-/- machos pesando 20g oriundos do Biotério da Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e 50 camundongos C57Bl 6 machos pesando 30g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 02/08/2017 a 10/07/2018.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

We certify that the Protocol n° 080/2015, entitled "*Effect of spironolactone on the production the mitochondrial DAMPS on inflammasome activation in type 2 diabetes mellitus*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/02/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 50 male C57BLKS/Jlepr db/db mice weighing 30g, 50 male C57BLKS/Jlepr db/+ mice weighing 30g, 50 female C57BLKS/Jlepr db/db mice weighing 30g and 50 female C57BLKS/Jlepr db/+ mice weighing 30g from the Maintenance Animal House of the Department of Pharmacology of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, 50 male Nalp3 KO mice weighing 20g, 50 male Caspase-1 KO mice weighing 20g and 50 male ASC KO mice weighing 20g from the Special Mice Breeding Center of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, 50 male NLRP1-/- mice weighing 20g from the Animal House of the Department of Immunology of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo and 50 male C57Bl 6 mice weighing 30g from the Central Animal House of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/10/2018.

Ribeirão Preto, 02 de agosto de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente da CEUA-FMRP – USP,
em exercício

ANEXO B – Artigo Relacionado à Tese**Activation of NLRP3 inflammasome contributes to aldosterone-induced vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus.**

Nathanne S Ferreira^{1*}, Thiago B Nascimento¹, Camila A Pereira¹, Camila Z Zanotto¹, Douglas S Prado¹, Josiane F Silva¹, Diane Meire Rassi¹, Maria Cristina Foss-Freitas², Jose C F Alves-Filho^{1,3}, Daniela C Sartori³, Rita C Tostes^{1*}

Departments of ¹Pharmacology, ²Clinical Medicine, Division of Endocrinology, and ³Biochemistry and Immunology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

Running Title: Aldosterone and inflammasome in diabetes.

Number of figures: 6

***Corresponding author**

Nathanne dos Santos Ferreira, Rita C. Tostes
Department of Pharmacology
Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo,
Av Bandeirantes 3900,
Ribeirao Preto, São Paulo 14049-900, Brazil.
Tel: +55 16 3602-3181
e-mail: rtostes@usp.br
nathanneferre@hotmail.com

ABSTRACT

Aldosterone activates the molecular platform inflammasome in cells of the immune system, an event that contributes to vascular dysfunction induced by the mineralocorticoid hormone. Aldosterone excess aggravates endothelial dysfunction in diabetes by promoting insulin resistance, fibrosis, oxidative stress and inflammation. However, it is not known whether activation of the inflammasome contributes to aldosterone-induced vascular dysfunction in diabetic conditions. In the present study we tested the hypothesis that aldosterone induces vascular dysfunction in type 2 diabetes via activation of mineralocorticoid receptors (MR) and assembly of the NLRP3 inflammasome. To determine whether aldosterone activates the NLRP3 inflammasome in type 2 diabetes and whether NLRP3 activation contributes to diabetes-associated vascular dysfunction, mesenteric arteries from control mice (db/m) and mice with type 2 diabetes (db/db) treated with vehicle, spironolactone (MR antagonist) or the NLRP3 antagonist MCC950 were used. Db/db mice exhibited increased vascular expression/activation of caspase-1 and IL-1 β , increased plasma IL-1 β levels, active caspase-1-positive macrophages in the peritoneal lavage as well as reduced acetylcholine (ACh) vasodilation, compared to control db/m mice. Treatment of db/db mice with spironolactone and MCC950 reduced vascular caspase-1 expression, decreased plasma IL-1 β levels and partly restored ACh responses. Spironolactone treatment also reduced the number of active caspase-1-positive-macrophages in db/db mice. Experiments with C57BL/6 mice (wild type, WT), NLRP3 knockout mice (*NLRP3*^{-/-}) and chimeric mice (WT mice $\rightarrow$ *NLRP3*^{-/-} mice) infused with vehicle or aldosterone showed that NLRP3 in vascular cells are key to aldosterone-induced vascular dysfunction and expression of inflammatory markers. These data clearly indicate that activation of both MR and NLRP3 in the vasculature contributes to diabetes-associated vascular dysfunction and a pro-inflammatory profile.

Key words: Type 2 diabetes, aldosterone, mineralocorticoid receptor, inflammasome, NLRP3.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is one of the most common chronic diseases worldwide and it is estimated that 592 million people will be affected by diabetes in 2035 (I.D.F., 2013). Many components, such as hyperglycemia, insulin resistance, reactive oxygen species (ROS) and inflammation are involved in the pathogenesis and vascular complications associated with DM.

Aldosterone is a mineralocorticoid hormone that plays a crucial role in the regulation of hydroelectrolytic balance (Davies e Struthers, 2002; Davies *et al.*, 2005; Swaminathan *et al.*, 2008). However, the excess of aldosterone induces vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation, contributing to the pathophysiology of cardiovascular diseases in diabetic patients and in experimental animal models of diabetes (Schiffrin, 2006; Briet e Schiffrin, 2012). Increased levels of aldosterone represent a cardiovascular risk not only in diabetes, but also in cardiovascular diseases, including stroke, coronary artery disease and congestive heart failure. The cardiovascular effects of aldosterone are mediated by genomic and non-genomic mechanisms via activation of mineralocorticoid receptors (MR) (Mcfarlane e Sowers, 2003) and G protein-coupled estrogen receptors (GPER) (Ferreira, Nathanne Santos *et al.*, 2015). Accordingly, MR antagonists, such as eplerenone and spironolactone, reduce the risk of morbidity and mortality in patients with severe heart failure, ameliorate nephropathy through anti-inflammatory mechanisms in type 2 diabetes, and reverse hypertension- and diabetes-associated vascular dysfunction (Ferreira, Nathanne Santos *et al.*, 2015; Silva, Bruder-Nascimento, *et al.*, 2015; Silva, Cau, *et al.*, 2015; Bruder-Nascimento *et al.*, 2016).

Inflammation plays a critical role in initiating vascular dysfunction, fibrosis and remodeling in response to aldosterone or MR activation (Brown, 2008). Many studies in the last decade have consistently shown that inflammation and activation of the innate and adaptive immune system contribute to target-organ injury in cardiovascular and metabolic diseases. Aldosterone stimulates the adaptive immune system (Herrada *et al.*, 2010; Kasal *et al.*, 2012;

Amador *et al.*, 2014) as well as the innate immune system, increasing the activity of proinflammatory transcription factors, the production of adhesion molecules, chemokines and pro-inflammatory cytokines (Jaffe e Mendelsohn, 2005).

We have recently shown that the NLRP3 inflammasome - a member of the *Nod-like receptors* (NLRs) that activates caspase-1 and the proteolytic cleavage of pro-IL-1 β and pro-IL-18 to their active forms IL-1 β and IL-18, respectively (Tschopp, 2011) – contributes to aldosterone-induced vascular damage (Bruder-Nascimento *et al.*, 2016). Other studies also showed that aldosterone excess contributes to fibrosis and induces renal tubular cell injury via MR and mitochondrial ROS-mediated NLRP3 activation (Doi *et al.*, 2014; Zhuang *et al.*, 2014). However, it is unknown whether aldosterone induces vascular dysfunction and complications in diabetes via NLRP3 inflammasome activation.

Therefore, the present study aimed to determine the contribution of NLRP3 to aldosterone-mediated vascular dysfunction in diabetic conditions. More specifically, we determined the involvement of mineralocorticoid and NLRP3 receptors in the vascular dysfunction in db/db mice, an experimental model of type 2 diabetes. We hypothesized that increased levels of aldosterone lead to inflammasome activation, contributing to vascular and inflammatory changes in diabetes. Direct evidence that aldosterone activates the inflammasome platform was obtained by evaluating the direct effects of aldosterone on cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) and bone marrow-derived macrophages. Whether aldosterone leads to vascular dysfunction by acting in immune cells or vascular cells was determined in mesenteric arteries of chimeric mice (WT mice $\rightarrow$ *NLRP3*^{-/-} mice) infused with vehicle or aldosterone.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals

All experimental protocols were performed in accordance with the ARRIVE Guidelines (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) and were approved by The Committee for Animal Research of the Ribeirao Preto Medical School - University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil (Protocol No. 80/2015).

Male, 10 to 14 weeks-old, *db/db* mice, an animal model of type 2 diabetes, and their counterpart controls (*db/m* mice) - purchased from The Jackson Laboratory - Bar Harbor, Maine, USA - were used. Male, 8 to 10 weeks-old, C57BL/6 wild-type (WT) and NLRP3 knockout (*NLRP3*^{-/-}) mice - from Genentech, San Francisco, CA, USA) - were also used. Mice were housed in individually ventilated cages (4 mice per cage – 600 cm²) in a room with controlled humidity (50 ± 10 %) and temperature (22 ± 2 °C), and light/dark cycles of 12 hours (h). Animals had free access to food (Nuvilab® mice chow pellets, Nuvital, Curitiba, Brazil) and potable tap water.

Control *db/m* and diabetic *db/db* mice were treated for 6 weeks with vehicle or the MR antagonist spironolactone (50 mg/kg body weight/day, mixed with the food). Body weight and food intake were weekly determined. Blood glucose levels were measured with a portable glucose meter Accu-Chek Active® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) at the beginning, third week and at the end of the treatment.

Control and *db/db* mice were also treated for 2 weeks with vehicle or the NLRP3 antagonist MCC950 (20 mg/kg/every 2 days, intraperitoneal injections). Body weight and blood glucose levels were weekly determined.

C57BL/6 WT and *NLRP3*^{-/-} mice were infused with vehicle or aldosterone (600 µg/kg/day) for 14 days using ALZET osmotic minipumps (Durect, Cupertino, CA), while receiving 1% saline in the drinking water (Kasal *et al.*, 2012). At the end of the treatment, blood was collected from anaesthetized mice (2% isoflurane vaporized with oxygen). Still under anesthesia, animals were killed by cervical dislocation and tissues of interest were collected.

Vascular Reactivity

After euthanasia, mesenteric arteries were rapidly excised and cleaned from fat tissue in an ice-cold (4 °C) Krebs–Henseleit-modified solution [(in mM): 130 NaCl, 4.7 KCl, 14.9 NaHCO₃, 1.18 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄·7H₂O, 5.5 glucose, 1.56 CaCl₂·2H₂O, and 0.026 EDTA], gassed with 5% CO₂ / 95% O₂ to maintain a pH of 7.4. Second-order branches of mesenteric arteries (≈2 mm in length with internal diameter ≈150–200 μm) were carefully dissected and mounted as rings in an isometric Mulvany-Halpern myograph (model 610M; Danish Myo Technology – DMT, Copenhagen, Denmark). Changes in force were recorded by a PowerLab 8/SP data acquisition system (ADInstruments). Second-order mesenteric arteries were adjusted to maintain a passive force of 13.3 kPa and allowed to equilibrate for about 30 min in Krebs–Henseleit solution. After the stabilization period, arterial integrity was assessed first by stimulation of vessels with 120 mmol/L of potassium chloride (KCl). After washing and a new stabilization period, endothelial function was assessed by testing the relaxant effect of acetylcholine (ACh, 10 μM) on vessels contracted with phenylephrine (PE, 3 μM). Mesenteric arteries exhibiting a relaxant response to ACh greater than 90% were considered endothelium-intact vessels. All experiments were performed with endothelium-intact vessels.

IL-1β and aldosterone measurement

IL-1β production was determined in serum of healthy volunteers, patients with type 2 diabetes and mice of the different experimental groups, using IL-1β ELISA kits (BD Biosciences, San Jose, CA). Aldosterone was measured in the serum of healthy volunteers, patients with type 2 diabetes and mice of the different experimental groups using aldosterone ELISA kits (Abcam, Cambridge, UK).

Western blotting

Expression of NLRP3, caspase-1 and IL-1 β was determined in mesenteric arteries and VSMC by western blot analysis. After stimulation/treatment protocols were performed, cells and tissues were frozen in liquid nitrogen and proteins were extracted, separated (40 μ g) by electrophoresis on 12% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline solution with Tween (0.1%) for 1 h at 24 °C. Membranes were incubated overnight at 4 °C with antibodies (at the indicated dilutions), as follows: anti-NLRP3 (1:500, R&D Systems, MAB7578), anti-caspase-1 (1:1000, Imgenex, NB100-56565F), anti-IL-1 β (1:500, Santa Cruz Biotechnology, sc-7884), anti-GAPDH (1:10000 Sigma, G9545-100UL) and anti- β -actin (1:3000, Cell Signaling, 4967L). After incubation with secondary antibodies, signals were revealed by chemiluminescence, visualized by autoradiography and quantified densitometrically. Results were normalized to GAPDH or β -actin expression and expressed as units relative to the control.

Vascular Smooth Muscle Cells Culture

Male C57BL/6 mice were euthanized and VSMC from the mesenteric bed were isolated and characterized as previously described (Chignalia *et al.*, 2012). Briefly, arteries were cleaned of adipose and connective tissues. VSMC were dissociated by digestion of arteriolar arcades with an enzymatic solution, consisting of (in mg/ml) 2 collagenase, 0.12 elastase, 0.36 soybean trypsin inhibitor, and 2 type I BSA in Ham's F-12 culture medium. Cells were incubated for 45 min at 37°C and then filtered through a 100- μ m nylon mesh. The cell suspension was centrifuged at 2,000 g and suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Carlsbad, CA), supplemented with 10% bovine serum, 2×10^{-3} mol/l glutamine, 2×10^{-2} mol/l HEPES (pH 7.4), and antibiotics. VSMC were identified by determination of α -actin expression by

fluorescence microscopy, and the absence of endothelial cells was confirmed by assessment of von Willebrand factor by real-time polymerase chain reaction (PCR; data not shown). Subconfluent cell cultures were rendered quiescent by serum deprivation for 24 h before experimentation. Low-passage cells (passages 4–7) from at least four different primary cultures were used in our experiments. VSCM were stimulated with either lipopolysaccharide (LPS) for 4 h, aldosterone (aldo) for 4 h or LPS 4 h plus aldo 4 h. LPS plus nigericin was used as a positive control.

Cultured bone marrow-derived macrophages

Mice were euthanized and bone marrow cells were collected from the lower leg bones using a 26G syringe and 3 mL of Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640). Red blood cells were lysed and the remaining cells were cultured in 10 mL L929 medium (RPMI supplemented with 10% FBS and 20% of L929 supernatant). On the third day, 10 mL of L929 medium were added to the cultures. On the seventh day, plates were washed with PBS to remove debris and dead cells, and adherent cells were removed using a cell scraper. Bone marrow–derived macrophages (BMDM) were stimulated with either LPS for 4 h, aldo for 4 h or LPS 4 h plus aldo 4 h. LPS plus nigericin was used as a positive control.

Caspase-1 activity by Flow Cytometry Analysis

Cultured bone marrow-derived macrophages were used. Cells were stained for 1 h using the FAM-FLICA caspase-1 assay (FAM-YVAD-FMK) kit (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were acquired on a FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA) and data were analyzed with the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Bone marrow transplantation

To determine whether NLRP3/inflammasome in the vasculature contributes to aldosterone-induced vascular injury, wild type (WT) and NLRP3 knockout mice (*NLRP3*^{-/-}) bone marrow transplantation was performed. Transplanted mice were later infused with aldosterone (600 ug/Kg/day for 14 days). Bone marrow transplantation (BMT) was performed according to a standard protocol previously described (26, 27). Adult (8-weeks old) WT and NLRP3 mice received 9 Gy total body irradiation 1 dose by 1 h to minimize gastrointestinal toxicity. Whole bone marrow cells were collected by flushing the femur from the WT donor mice with PBS. Recipient mice were intravenously (through the tail vein) injected with bone marrow cells. Using this protocol, three groups of bone marrow chimeric mice were produced as follows: WT→WT, WT→WT+aldo and WT→*NLRP3*^{-/-}+aldo. Aldosterone infusion was performed 6-8 weeks after bone marrow transplantation.

Aldosterone, Hyperglycemia and IL-1 β in patients with type 2 Diabetes

To analyze whether increased aldosterone levels are correlated with NLRP3 inflammasome activation in human diabetes, blood samples were taken from 10 patients diagnosed with type 2 diabetes, selected in the Diabetes Outpatient Clinic of the University Hospital of Ribeirao Preto Medical School, to determine plasma levels of IL-1 β and aldosterone. All patients gave written informed consent to participate and the protocol was approved by the Ethics Committee on Human Research of the University Hospital of Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo (080/2015).

Type 2 diabetes patients, from both sexes, 30 to 60 years-old, body mass index (BMI) between 20 and 40 kg/m² and fasting glycaemia between 120 and 270 mg/dL were included in the study. Age-matched healthy volunteers were used as controls.

Reference values are shown in Table I in the Data Supplement. Plasma IL-1 β and aldosterone levels were measured by ELISA.

Drugs

Phenylephrine, acetylcholine, aldosterone, spironolactone, lipopolysaccharide (L4130), nigericin (N7143), MCC950 (CP-456773 sodium salt) were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

Data analysis and statistical procedures

Contractile responses to PE are expressed as percentage of 120 mM KCl-induced response. No significant difference was found in 120 mM KCl-induced contractions between arteries from control and db/db mice ($p > 0.05$). Relaxation to ACh is expressed as percentage of 3 μ M PE-induced contraction. The individual concentration–response curves were fitted by non-linear regression analysis. pD_2 (defined as the negative logarithm of the EC_{50} values) and maximal response (E_{max}) were compared by t -tests or ANOVA, when appropriated. The Prism software, version 5.0 (GraphPad Software Inc., San. Diego, CA, USA) was used to analyze these parameters as well as to fit the sigmoid curves. Data are presented as mean $\pm$ SEM. N represents the number of animals used. p values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Aldosterone activates the NLRP3 inflammasome in vascular smooth muscle cells and macrophages.

To determine whether aldosterone activates the NLRP3 inflammasome in vascular cells and macrophages, cultured VSMC and bone marrow-derived macrophages were stimulated with aldosterone in the presence of LPS or vehicle, and caspase-1 and IL-1 β expression and

activity were determined. VSMC stimulated with aldosterone for 4 h did not exhibit increased expression of active caspase-1 compared to vehicle-stimulated VSMC (Figure 1A). Aldosterone for 4 h in cells that were primed with LPS for 4 h increased the expression of mature IL-1 β in comparison to vehicle-stimulated VSMC (Figure 1B). In bone marrow-derived macrophages, the stimulus with aldosterone for 4 h, in the presence or absence of LPS, increased caspase-1 activity in comparison to vehicle-treated cells; although not at the same magnitude seen in macrophages stimulated with the positive control, LPS plus Nigericine (Figure 1C).

NLRP3 in the vasculature contributes to aldosterone-induced endothelial dysfunction and vascular inflammation.

Considering that we have recently shown that the absence of NLRP3 on bone marrow cells prevents vascular dysfunction induced by aldosterone, we determined whether the absence of NLRP3 in the vasculature, but not in bone marrow-derived cells, also prevents aldosterone-induced vascular injury.

To evaluate the effects of aldosterone-induced NLRP3/inflammasome activation in the vasculature, aldosterone was infused in control and NLRP3^{-/-} mice after bone marrow transplantation (bone marrow from WT mice was transplanted into NLRP3^{-/-} mice, i.e., WT $\rightarrow$ NLRP3^{-/-}). Phenylephrine-induced contractions were increased in mesenteric arteries from WT $\rightarrow$ WT mice infused with aldosterone, when compared with WT $\rightarrow$ WT mice infused with vehicle. In mice WT $\rightarrow$ NLRP3^{-/-} the absence of NLRP3 in the vasculature partially prevented the hypercontractility induced by phenylephrine (Figure 2A). Mesenteric resistance arteries from WT $\rightarrow$ WT mice infused with aldosterone exhibited reduced ACh dilation, which was abrogated in WT $\rightarrow$ NLRP3^{-/-} mice (Figure 2B), showing that the presence of NLRP3 in the vasculature contributes to vascular dysfunction in aldosterone-treated mice. Expression of

inflammatory markers, including as tumor-necrosis factor alpha (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin 6 (IL-6), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), was attenuated in WT $\rightarrow$ NLRP3 $^{-/-}$ mice infused with aldosterone (Figure 2C-F). Expression of the inflammasome components (NLRP3, ASC, NLRC4, caspase-1, IL-1 β and IL-18) was not different between the different groups (Supplemental Figure SI). These results suggest that NLRP3/inflammasome in the vasculature plays a crucial role on aldosterone-induced vascular damage.

Spironolactone treatment reduces vascular dysfunction and inflammasome activation in db/db mice.

The involvement of aldosterone in diabetes complications is associated with activation of MR and inflammatory processes (Hollenberg *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2006; Silva, Bruder-Nascimento, *et al.*, 2015; Silva, Cau, *et al.*, 2015). To determine the contribution of aldosterone/MR on inflammasome activation, db/db mice were treated with spironolactone. Db/db mice displayed increased glucose levels and increased body weight compared to control mice. Treatment with spironolactone for 6 weeks reduced blood glucose levels in db/db mice (Figure 3A), but did not alter body weight in control or db/db mice (Figure 3B). Phenylephrine-induced contractions were similar in mesenteric arteries from vehicle-treated control and db/db mice. Spironolactone treatment decreased PE potency in arteries from both control and db/db mice (Figure 3C). Mesenteric resistance arteries from db/db mice exhibited reduced ACh dilation, which was prevented/abrogated by spironolactone treatment (Figure 3D). Plasma IL-1 β levels were increased in db/db mice and treatment with the MR receptor antagonist decreased IL-1 β levels (Figure 3E). The expression of active caspase-1 and mature IL-1 β was increased in mesenteric arteries from db/db mice. Spironolactone treatment reduced the activation of

caspase-1 (Figure 3G) and mature IL-1 β content (Figure 3H) in mesenteric arteries from db/db mice.

Considering the importance of macrophages in inflammatory responses, the potential of aldosterone to activate the inflammasome and the effect of MR antagonist treatment on macrophages from db/db mice were determined. In the peritoneal lavage, the number of active caspase-1-positive macrophages was increased in db/db mice compared to control mice. Spironolactone treatment reduced the number of active caspase-1-positive-macrophages in db/db mice (Figure 3F), supporting that aldosterone activates NLRP3 inflammasome in immune cells of animals with type 2 diabetes.

These results suggest that aldosterone/MR contributes to vascular damage and NLRP3/inflammasome activation in the vasculature and macrophages of db/db mice.

NLRP3 antagonist treatment reduces vascular dysfunction and inflammasome activation in mesenteric arteries of db/db mice.

To determine the direct involvement of NLRP3 in diabetes-associated vascular dysfunction, db/db mice were treated for 2 weeks with a NLRP3 antagonist. Treatment with MCC950 did not reduce blood glucose levels (Figure 4A and Supplemental Figure II), and did not alter body weight in control or db/db mice (Figure 4B). Reduced ACh dilation in mesenteric resistance arteries from db/db mice was prevented by treatment with MCC950 (Figure 4D). MCC950 did not alter phenylephrine-induced contractions in mesenteric arteries of the experimental groups (Figure 4C). Treatment with the NLRP3 antagonist reduced plasma levels of IL-1 β in db/db mice (Figure 4F). MCC950 also reduced the vascular expression of inflammasome components and inflammatory markers in db/db mice. However, MCC950 did not reduce aldosterone levels, in comparison to vehicle-treated db/db mice (Figure 4E). Treatment with MCC950 did not decrease the expression of inflammasome markers in

mesenteric arteries (Figure 5A and 5B) or macrophages in the peritoneal lavage (Figures 5C and 5D). The effects of MCC950 on ROS generation in mesenteric of arteries of control and db/db were assessed with lucigenin. The NLRP3 inhibitor abolished ROS generation in db/db mice (Figure 5E). MCC950 also attenuated aldosterone-induced increased ROS generation in mesenteric arteries (Figure 6F).

Plasma levels of aldosterone and IL-1 β in Healthy Volunteers and Patients with Type 2 Diabetes.

To further investigate a link between aldosterone and diabetes complications, or more specifically, in the inflammasome activation, we evaluated whether plasma levels of aldosterone are correlated with levels of the cytokine IL-1 β in volunteers and patients with type 2 diabetes. No differences were observed in aldosterone plasma levels between volunteers and patients with type 2 diabetes (Figure 6). However, when patients were divided according to their aldosterone levels: <50pg/mL or >50pg/mL (Figure 6C), those with levels of aldosterone >50pg/mL displayed higher levels of glucose and of the cytokine IL-1 β (Figure 6).

DISCUSSION

Major findings from this study demonstrate an important role for aldosterone in inflammasome activation and in diabetes vascular dysfunction. In particular, (1) aldosterone induces inflammasome activation in VSMC and macrophages, (2) aldosterone induces vascular dysfunction in mesenteric arteries of control animals, which is attenuated in chimeric animals that do not express vascular NLRP3 receptors [WT $\rightarrow$ NLRP3-/-+aldo], (3) db/db mice display increased levels of aldosterone and spironolactone, a MR antagonist, prevents caspase-1 activation and IL-1 β production in mesenteric arteries, and (4) treatment with NLRP3

antagonist reduces vascular activation of NLRP3 inflammasome, decreases vascular ROS generation and reverses endothelial dysfunction in db/db mice.

Plasma aldosterone levels, increased in humans and experimental models with diabetes, contribute to increases in inflammatory markers, such as TNF- α , chemotactic protein macrophage (MCP-1), transforming growth factor-beta (TGF- β) and IL-1 β (Guo *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006). Additionally, aldosterone stimulates proinflammatory transcription factors such as nuclear factor kappa B (NF- κ B) (30-33). NF- κ B induces the production of adhesion molecules, chemokines and cytokines (34), pro-IL-1 β and pro-IL-18, which are converted to their mature forms after activation of the inflammasome. Aldosterone activates the inflammasome by stimulating both signals, via transcription of NLRP3 components and generation of the second signal, as shown by Bruder *et al.*, 2016.

The involvement of MR in inflammatory processes is related to the activation of MR in cells of the immune system. Accordingly, animals with deletion of MR in macrophages are protected from cardiac fibrosis and increased blood pressure induced by treatment with deoxycorticosterone and salt (DOCA-salt) for 8 weeks (Rickard *et al.*, 2009). In addition, MR deficiency in macrophages mimics the effects of MR antagonists and protects against cardiac hypertrophy, fibrosis, and vascular damage caused by L-NAME and angiotensin II (REF). Moreover, MR deletion reduces the proinflammatory phenotype of macrophages, decreasing levels of TNF- α and factors related to the fibrotic process, in part by aldosterone-independent mechanisms (Usher *et al.*, 2010). Here, we demonstrated that db/db animals display increased caspase-1 activity in macrophages and spironolactone treatment reduces this activity.

Doi *et al.* (2014) reported that the immunosuppressive drug mizoribine reduces blood pressure levels and renal inflammasome markers such IL-1 β , caspase-1 and NLRP3 in DOCA/salt hypertensive rats (Doi *et al.*, 2014). Mice with DOCA/salt-induced hypertension exhibit increased renal expression of the inflammasome components, and treatment with a

novel inflammasome inhibitor, MCC950, reverses hypertension and inflammatory markers. ASC^{-/-} mice submitted to DOCA/salt hypertension also displayed blunted pressor responses and did not exhibit increased renal inflammatory markers expression, showing an important role of inflammasome components in the development of hypertension and hypertension-associated renal abnormalities.

In the vasculature, mature IL-1 β , the final product of inflammasome activation, directly influences vascular responses. Incubation of aortic rings from stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) for 1 hour with IL-1 β significantly increases contractility via activation of COX- and Src-kinase-related signaling pathways (Dorrance, 2007). In addition, vascular dysfunction in an experimental model of type 1 diabetes is related to IL-1R receptor activation, since treatment with anankira (IL-1 receptor antagonist) reduces endothelial dysfunction, vascular oxidative stress and inflammation (Vallejo *et al.*, 2014). Thus, in situations where an inflammatory process is already installed, the activation of the inflammasome seems to further contribute to vascular changes. Activation of components of the innate immune system in the vasculature and immune cells of animals with type 2 diabetes, as shown in the present study, further confirm a key contribution of the immune system to vascular injury in cardiovascular/metabolic diseases.

Inflammasome activation in macrophages of db/db mice impairs wound healing, increases inflammasome markers and reduces expression of endogenous inflammasome inhibitors, such as PI-9 and caspase-12. Additionally, transplantation of bone marrow-derived cells from NLRP3 or caspase-1 knockout mice to db/db mice improves wound healing, and the participation of macrophages in the healing process (Mirza *et al.*, 2014). Our data show that inhibition of NLRP3 prevents vascular dysfunction and the expression of inflammatory markers in the vasculature of db/db mice, extending our knowledge on the implications of NLRP3 activation in diabetes.

In conclusion, our study shows that aldosterone induces vascular dysfunction in type 2 diabetes via NLRP3 inflammasome activation, which increases signaling processes associated with inflammation and vascular dysfunction. This may be especially important in conditions associated with increased aldosterone levels, such as obesity, metabolic syndrome, and arterial hypertension.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant agreement n° 2013/08216-2 (Center for Research in Inflammatory Diseases) and by the University of São Paulo NAP-DIN under grant agreement n.º 11.1.21625.01.0. We are grateful to V. Dixit (Genentech, USA) for providing us with the NLRP3^{-/-} mice. NSF received a fellowship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil.

N.S.F, T.B.N, J.C.A.F, D.C. and R.C.T. designed the experiments; N.S.F, T.B.N, C.A.P, C.Z.Z, C.P.M., F.L.A.C.M, I.P.O, F.R, D.C, D.S.P. and P.C.E performed the experiments; N.S.F, D.S.P, D.C. and T.B.N. processed and analyzed the data; N.S.F. and R.C.T. wrote the manuscript; and all authors commented on the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. I.D.F., *International Diabetes Federation - Diabetes Atlas*. 6th Edition, 2013.
2. Davies, J., et al., *Spironolactone reduces brachial pulse wave velocity and PIIINP levels in hypertensive diabetic patients*. Br J Clin Pharmacol, 2005. **59**(5): p. 520-3.
3. Davies, J. and A. Struthers, *The potential benefits of aldosterone antagonism in Type 2 diabetes mellitus*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2002. **3**(3): p. 150-5.
4. Swaminathan, K., et al., *Spironolactone for poorly controlled hypertension in type 2 diabetes: conflicting effects on blood pressure, endothelial function, glycaemic control and hormonal profiles*. Diabetologia, 2008. **51**(5): p. 762-8.
5. Briet, M. and E.L. Schiffrin, *Vascular Actions of Aldosterone*. J Vasc Res, 2012. **50**(2): p. 89-99.
6. Schiffrin, E.L., *Effects of aldosterone on the vasculature*. Hypertension, 2006. **47**(3): p. 312-8.
7. McFarlane, S.I. and J.R. Sowers, *Cardiovascular endocrinology 1: aldosterone function in diabetes mellitus: effects on cardiovascular and renal disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(2): p. 516-23.
8. Ferreira, N.S., et al., *Diabetes impairs the vascular effects of aldosterone mediated by G protein-coupled estrogen receptor activation*. Frontiers in Pharmacology, 2015. **6**.
9. Bruder-Nascimento, T., et al., *NLRP3 Inflammasome Mediates Aldosterone-Induced Vascular Damage*. Circulation, 2016.
10. Silva, M.A., et al., *Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 269.
11. Silva, M.A., et al., *Mineralocorticoid receptor blockade prevents vascular remodelling in a rodent model of type 2 diabetes mellitus*. Clin Sci (Lond), 2015. **129**(7): p. 533-45.
12. Brown, N.J., *Aldosterone and vascular inflammation*. Hypertension, 2008. **51**(2): p. 161-7.
13. Kasal, D.A., et al., *T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury*. Hypertension, 2012. **59**(2): p. 324-30.
14. Amador, C.A., et al., *Spironolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes*. Hypertension, 2014. **63**(4): p. 797-803.
15. Herrada, A.A., et al., *Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity*. J Immunol, 2010. **184**(1): p. 191-202.
16. Jaffe, I.Z. and M.E. Mendelsohn, *Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells*. Circ Res, 2005. **96**(6): p. 643-50.
17. Tschopp, J., *Mitochondria: Sovereign of inflammation?* Eur J Immunol, 2011. **41**(5): p. 1196-202.
18. Doi, T., et al., *Mizoribine ameliorates renal injury and hypertension along with the attenuation of renal caspase-1 expression in aldosterone-salt-treated rats*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93513.
19. Zhuang, Y., et al., *NLRP3 inflammasome mediates albumin-induced renal tubular injury through impaired mitochondrial function*. J Biol Chem, 2014. **289**(36): p. 25101-11.
20. Chignalia, A.Z., et al., *Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src-dependent pathways*. Hypertension, 2012. **59**(6): p. 1263-71.
21. Guo, C., et al., *Mineralocorticoid receptor antagonist reduces renal injury in rodent models of types 1 and 2 diabetes mellitus*. Endocrinology, 2006. **147**(11): p. 5363-73.

22. Hollenberg, N.K., et al., *Plasma aldosterone concentration in the patient with diabetes mellitus*. *Kidney Int*, 2004. **65**(4): p. 1435-9.
23. Guo, Z., et al., *COX-2 up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperreactivity in spontaneous diabetic db/db mice*. *Cardiovasc Res*, 2005. **67**(4): p. 723-35.
24. Rickard, A.J., et al., *Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure*. *Hypertension*, 2009. **54**(3): p. 537-43.
25. Usher, M.G., et al., *Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(9): p. 3350-64.
26. Dorrance, A.M., *Interleukin 1-beta (IL-1beta) enhances contractile responses in endothelium-denuded aorta from hypertensive, but not normotensive, rats*. *Vascul Pharmacol*, 2007. **47**(2-3): p. 160-5.
27. Vallejo, S., et al., *The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Cardiovasc Diabetol*, 2014. **13**: p. 158.
28. Mirza, R.E., et al., *Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice*. *Diabetes*, 2014. **63**(3): p. 1103-14.

LEGENDS OF FIGURES

FIGURE 1. Aldosterone activates caspase-1 and increases IL-1 β expression in vascular smooth muscle cells and macrophages. At the top, representative immunoblotting for (A) pro-caspase-1, caspase-1 and β -actin and (B) pro-IL-1 β , IL-1 β and β -actin expression in VSMC stimulated with LPS, LPS+NIG, Aldo and LPS+Aldo. The graphs show the ratio of caspase-1/pro-caspase-1 and IL-1 β /pro-IL-1 β , which were normalized to β -actin expression. (C) Representative images of *dot plot* and graphs showing the percentage of caspase-1 activity in cultured bone marrow-derived macrophages stimulated with LPS+NIG, aldosterone for 4 h or LPS+aldo. The graph shows the percentage of caspase-1 activity. The data represent the mean $\pm$ S.E.M (n=3-5 per group). One-way ANOVA with Bonferroni post-test, $p < 0.05$ * *vs.* Vehicle, # *vs.* LPS+NIG. Aldo: Aldosterone, LPS: Lipopolysaccharide and NIG: Nigericine.

FIGURE 2. NLRP3 in the vasculature contributes to aldosterone-induced endothelial dysfunction and vascular inflammation. Contractile responses to phenylephrine (A) and relaxation responses to acetylcholine (B) in mesenteric arteries from WT $\rightarrow$ WT mice treated with vehicle, WT $\rightarrow$ WT mice treated with aldosterone (+ Aldo) and WT $\rightarrow$ NLRP3 $-/-$ + Aldo (n=5-7 mice per group). mRNA expression of the inflammatory markers TNF- α (C), iNOS (D), IL-6 (E), ICAM-1 (F) and VCAM-1 (G), determined by quantitative RT-PCR, in mesenteric arteries isolated from WT $\rightarrow$ WT, WT $\rightarrow$ WT + Aldo and WT $\rightarrow$ NLRP3 $-/-$ + Aldo mice (n=5 mice per group). One-way ANOVA with Bonferroni post-test, $p < 0.05$. * *vs.* WT $\rightarrow$ WT and # *vs.* WT $\rightarrow$ WT+Aldo. Aldo: Aldosterone.

FIGURE 3. MR activation contributes to increased blood glucose levels, vascular dysfunction and inflammasome activation in diabetes. Plasma glucose levels (A), body weight (B), contractile responses of mesenteric arteries to phenylephrine (C) and relaxation to

acetylcholine (D), plasma levels of the cytokine IL-1 β (E) and percentage of caspase-1 activity in macrophages of peritoneal lavage (F) in control and db/db mice treated with vehicle or spironolactone for 6 weeks. Representative immunoblotting and corresponding graphs depicting vascular expression of caspase-1 (G) and IL-1 β (H), determined by western blot, in mesenteric arteries from vehicle- and spironolactone-treated control and db/db mice. Data represent the mean $\pm$ S.E.M (n=4-7 mice per group). One-way ANOVA with Bonferroni post-test, $p < 0.05$ * *vs.* control; # *vs.* db/db vehicle. Spiro: Spironolactone, PE: phenylephrine, Ach: acetylcholine.

FIGURE 4. NLRP3 receptor contributes to vascular dysfunction in diabetes. Plasma glucose levels (A), body weight (B), contractile responses of mesenteric arteries to phenylephrine (C) and relaxation responses to acetylcholine (D). Plasma levels of aldosterone (E) and IL-1 β (F) and the positive correlation between blood glucose and aldosterone levels (G) in control and db/db mice treated with vehicle or MCC950 for 14 days. Data represent the mean $\pm$ S.E.M (n=3-7 mice per group). One-way ANOVA with Bonferroni post-test, $p < 0.05$ * *vs.* control; # *vs.* db/db vehicle. MCC950: NLRP3 antagonist, PE: phenylephrine, ACh: acetylcholine.

Figure 5. MCC950 abolishes reactive oxygen species (ROS) generation in db/db mice. Representative immunoblotting and corresponding graphs showing vascular expression of caspase-1 (A) and NLRP3 (B), in mesenteric arteries and expression of caspase-1 (C) and IL-1 β (D) in the peritoneal lavage from vehicle- and MCC950 treated control and db/db mice. determined by western blot. The effects on ROS generation were assessed with lucigenin after 1 h of stimulation in the presence of MCC950 (NLRP3 inhibitor, 1 μ M) or vehicle of control and db/db mice (E). Mesenteric arteries stimulated with aldosterone (30 min) in the presence

of spironolactone or MCC950 (1h) (F). RLU, relative light units. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test .*, $p < 0,05$ vs. control vehicle; #, db/db vehicle.

FIGURE 6. High levels of glucose correlate with aldosterone and IL-1 β in patients with type 2 Diabetes. Plasma levels of aldosterone (A) and the cytokine IL-1 β (B) in Control (healthy volunteers) and type 2 diabetes patients. Patients with type 2 diabetes were divided according to their aldosterone levels (C), levels of IL-1 β (D), and blood glucose (E). The correlation between aldosterone and IL-1 β in healthy volunteers and in patients with type 2 diabetes. Data represent the mean $\pm$ S.E.M . One-way ANOVA with Bonferroni post-test, $p < 0.05$ * vs. Control Patient; # vs. Patients with levels $< 50\text{pg/mL}$ of aldosterone.

FIGURES

SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTAL FIGURES

SUPPLEMENTAL FIGURE S1. Expression of inflammasome components in mesenteric arteries from wild type mice infused with vehicle or Aldo. Vascular expression of inflammasome markers was determined by qPCR. Data represent the mean $\pm$ S.E.M (n=4 mice per group). T-test, $p < 0.05$ * vs. WT. Aldo: aldosterone.

SUPPLEMENTAL FIGURE SII. Treatment with the NLRP3 antagonist does not alter body weight or glucose tolerance in db/db mice. Plasma glucose levels during the days of treatment with NLRP3 antagonist (A), Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) (B) Area Under

Curve of the Oral Glucose Tolerance Test (C) in control and db/db mice treated with vehicle or MCC950 (10 mg/Kg/day) for 2 weeks (n=3-7 mice per group). Data represent the mean $\pm$ S.E.M. Two-way ANOVA with Bonferroni post-test, $p < 0.05$ * *vs.* control; # *vs.* db/db vehicle. MCC950: NLRP3 antagonist.

SUPPLEMENTARY TABLE 1. Information of the healthy volunteers.

Healthy Volunteers	
Age (Years)	41.2±2.3(n=6)
Gender <i>male/female</i>	2/4

SUPPLEMENTARY TABLE 2. Information of the patients diagnosed with type 2 diabetes.

Patients with type 2 diabetes	
Age (Years)	60±2.1(n=10)
HbAC (%)	9.1±0.6
Gender <i>male/female</i>	4/6

ANEXO C – Artigo Não Relacionado à Tese

NLRP3 Inflammasome Mediates Aldosterone-Induced Vascular Damage

Thiago Bruder-Nascimento, Nathanne S. Ferreira, Camila Z. Zanotto, Fernanda Ramalho, Isabela O. Pequeno, Vania C. Olivon, Karla B. Neves, Rheure Alves-Lopes, Eduardo Campos, Carlos Alberto A. Silva, Rubens Fazan, Daniela Carlos, Fabiola L. Mestriner, Douglas Prado, Felipe V. Pereira, Tarcio Braga, Joao Paulo M. Luiz, Stefany B. Cau, Paula C. Elias, Ayrton C. Moreira, Niels O. Câmara, Dario S. Zamboni, Jose Carlos Alves-Filho and Rita C. Tostes

Circulation. 2016;134:1866-1880; originally published online November 1, 2016;
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024369

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the
World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/134/23/1866>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circ.ahajournals.org/content/suppl/2016/11/01/CIRCULATIONAHA.116.024369.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

NLRP3 Inflammasome Mediates Aldosterone-Induced Vascular Damage

BACKGROUND: Inflammation is a key feature of aldosterone-induced vascular damage and dysfunction, but molecular mechanisms by which aldosterone triggers inflammation remain unclear. The NLRP3 inflammasome is a pivotal immune sensor that recognizes endogenous danger signals triggering sterile inflammation.

METHODS: We analyzed vascular function and inflammatory profile of wild-type (WT), NLRP3 knockout (*NLRP3*^{-/-}), caspase-1 knockout (*Casp-1*^{-/-}), and interleukin-1 receptor knockout (*IL-1R*^{-/-}) mice treated with vehicle or aldosterone (600 µg·kg⁻¹·d⁻¹ for 14 days through osmotic mini-pump) while receiving 1% saline to drink.

RESULTS: Here, we show that NLRP3 inflammasome plays a central role in aldosterone-induced vascular dysfunction. Long-term infusion of aldosterone in mice resulted in elevation of plasma interleukin-1β levels and vascular abnormalities. Mice lacking the IL-1R or the inflammasome components NLRP3 and caspase-1 were protected from aldosterone-induced vascular damage. In vitro, aldosterone stimulated NLRP3-dependent interleukin-1β secretion by bone marrow-derived macrophages by activating nuclear factor-κB signaling and reactive oxygen species generation. Moreover, chimeric mice reconstituted with NLRP3-deficient hematopoietic cells showed that NLRP3 in immune cells mediates aldosterone-induced vascular damage. In addition, aldosterone increased the expression of NLRP3, active caspase-1, and mature interleukin-1β in human peripheral blood mononuclear cells. Hypertensive patients with hyperaldosteronism or normal levels of aldosterone exhibited increased activity of NLRP3 inflammasome, suggesting that the effect of hyperaldosteronism on the inflammasome may be mediated through high blood pressure.

CONCLUSIONS: Together, these data demonstrate that NLRP3 inflammasome, through activation of IL-1R, is critically involved in the deleterious vascular effects of aldosterone, placing NLRP3 as a potential target for therapeutic interventions in conditions with high aldosterone levels.

Thiago Bruder-Nascimento, PhD

Nathanne S. Ferreira, MSc

Camila Z. Zanotto, MSc

Fernanda Ramalho

Isabela O. Pequeno

Vania C. Olivon, PhD

Karla B. Neves, PhD

Rheure Alves-Lopes, PhD

Eduardo Campos

Carlos Alberto A. Silva

Rubens Fazan, PhD

Daniela Carlos, PhD

Fabiola L. Mestriner, MSc

Douglas Prado, MSc

Felipe V. Pereira, PhD

Tarcio Braga, PhD

Joao Paulo M. Luiz, MSc

Stefany B. Cau, PhD

Paula C. Elias, MD

Ayrton C. Moreira, MD, PhD

Niels O. Câmara, MD, PhD

Dario S. Zamboni, PhD

Jose Carlos Alves-Filho, PhD

Rita C. Tostes, PhD

Correspondence to: Thiago Bruder-Nascimento, PhD, or Rita C. Tostes, PhD, FAHA, Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo-USP, Av Bandeirantes 3900, Ribeirao Preto-SP 14049-900, Brazil. E-mail bruderthiago@usp.br or rtostes@usp.br

Sources of Funding, see page 1878

Key Words: aldosterone ■ immunology ■ inflammasomes ■ inflammation

© 2016 American Heart Association, Inc.

Clinical Perspective

What Is New?

- We identify a new mechanism involving the NLRP3 inflammasome whereby aldosterone, through interleukin-1 receptor, influences vascular function.
- Cells from the bone marrow are involved in the NLRP3 inflammasome axis underlying aldosterone-induced vascular dysfunction.
- Aldosterone mediates the first and second signals necessary for inflammasome activation through nuclear factor- κ B stimulation and reactive oxygen species generation, respectively.
- NLRP3 inflammasome activation is increased in immune cells from hypertensive patients, including those with hyperaldosteronism.
- Our data indicate that the immune system, through the NLRP3 inflammasome, has a central role in aldosterone- and hypertension-associated vascular abnormalities.

What Are the Clinical Implications?

- Aldosterone contributes to hypertension, atherosclerosis, and cardiometabolic abnormalities by inducing endothelial dysfunction, vascular inflammation, fibrosis, and remodeling.
- NLRP3 inflammasome activation in leukocytes is key to aldosterone-induced vascular dysfunction and is potentially involved in the cardiovascular complications in patients with hyperaldosteronism and hypertension.
- Our data identify the NLRP3 inflammasome as a putative novel therapeutic target in pathologies associated with vascular dysfunction, especially in those conditions in which aldosterone plays a role.

Aldosterone is a steroid hormone synthesized mainly by the adrenal glomerulosa in response to various stimuli, including angiotensin II and adrenocorticotrophic hormone. Classically, aldosterone, through activation of mineralocorticoid receptors (MRs), upregulates apical epithelial sodium channels and increases sodium reabsorption at the level of the distal nephron.^{1,2} However, excessive aldosterone production results in vascular damage, dysfunction, and remodeling.^{1–6}

Inflammation is a key feature in the pathogenesis of many cardiovascular disorders, including atherosclerosis, acute coronary syndromes, stroke, and arterial hypertension.^{4–8} Aldosterone participates in the physiopathological processes, including vascular injury, and in cardiovascular and metabolic diseases, at least in part by causing endothelial dysfunction and vasoconstriction, remodeling, oxidative stress, and inflammation.^{1,4,5,7,9,10} However, molecular mechanisms by which aldosterone triggers inflammation remain unclear.

Members of the Nod-like receptor (NLR) family have emerged as important damage innate immune sensors.^{11,12} NLRP3, one of the most well-characterized members of the NLR family, regulates the assembly of the inflammasome, a multimeric complex that contains active caspase-1, which processes and increases interleukin (IL)-1 β and IL-18 secretion. IL-1 β is transcriptionally regulated when damage components are sensed by pattern recognition receptors.^{11–14} NLRP3 inflammasome responds to a variety of signals that are indicative of damage to the host, including environmental irritants, endogenous danger signals, pathogens, and mitochondria-derived reactive oxygen species (ROS).^{11,15,16} In addition to infection,^{11,12} NLRP3 inflammasome contributes to target organ damage in type 2 diabetes mellitus¹⁷ and cardiovascular and renal diseases.^{18–22}

Here, we addressed the molecular mechanisms of aldosterone-induced vascular dysfunction. We found that the NLRP3 inflammasome is engaged in the vascular complications provoked by aldosterone. It is worth noting that NLRP3 inflammasome in immune cells triggers vascular dysfunction, inflammation, and remodeling through activation of the IL-1 receptor. Of importance, increased NLRP3 inflammasome activation occurs in immune cells of patients with hyperaldosteronism and hypertension. NLRP3 inflammasome activation may represent a major trigger of vascular disease in conditions associated with aldosterone excess or high levels of blood pressure (BP).

METHODS

Animals

Eight- to 10-week-old male C57BL6/J mice (wild-type [WT]) and knockout mice for IL-1 receptor (*IL-1R*^{−/−}), caspase-1 (*Casp-1*^{−/−}), and NLRP3 (*NLRP3*^{−/−}) were infused with vehicle or aldosterone (600 μ g/kg per day) for 14 days with ALZET osmotic minipumps (Durect, Cupertino, CA) while receiving 1% saline in the drinking water.⁴ Mice were kept in the animal facility of the Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, under controlled temperature (22°C–24°C) and humidity and 12-hour light/dark cycles, were fed a standard diet, and were given water ad libitum. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo (protocol 012/2013-1) and are in accordance with the Guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation.

Bone Marrow Transplantation

Bone marrow transplantation was performed according to previous studies.^{23,24} Recipient WT mice at 10 weeks of age were exposed to 9-Gy total body irradiation. After 1 day, whole bone marrow cells collected from the femur of WT or *NLRP3*^{−/−} donor mice were injected intravenously (through the tail vein) into the recipient mice. Three groups of bone marrow chimera were produced as follows: bone marrow from WT to WT recipient

mice treated with vehicle (WT→WT), WT to WT mice infused with aldosterone (WT→WT+aldosterone), and bone marrow from *NLRP3*^{-/-} to WT recipient mice infused with aldosterone (*NLRP3*^{-/-}→WT+aldosterone). Aldosterone infusion was performed 6 to 8 weeks after bone marrow transplantation. The effectiveness of the irradiation procedure was analyzed by survival in mice that were not submitted to the bone marrow transplantation or treated with antibiotics (Figure I in the online-only Data Supplement).

BP Measurement

After 11 days of aldosterone infusion, mice were anesthetized with a mixture of isoflurane 2% and O₂, and the surgical procedures were carried out in aseptic conditions. The animals were placed in the supine position, and a cervical incision was made. Polyethylene catheters (Clay-Adams, Northridge, CA) were implanted in the left carotid artery for BP measurement. Catheters were filled with heparinized saline (100 IU/mL), capped, and tunneled subcutaneously to the back of the neck. All animals received penicillin and streptomycin (200 IU/g and 80 µg/g, respectively) and were allowed to recover for 2 days. BP measurements were carried out in conscious, unrestrained mice in their own cages 3 days after surgery. On the day of the experiment, the arterial catheter was connected to a pressure transducer (model DPT-100 Deltran, Utah Medical Products, Midvale, UT), and the venous catheter was connected to a polyethylene (Clay-Adams) extension. Mice were allowed to rest for 10 minutes (acclimatization period), and BP was continuously recorded for 20 minutes at 4 kHz (data record) with a computer equipped with an analog-to-digital interface (PowerLab/4SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO).

IL-1β Measurement

IL-1β concentration in cell culture supernatant, plasma, and serum samples was assessed with an IL-1β ELISA kit (BD Biosciences).

Vascular Structure Analysis

Mesenteric resistance arteries were cannulated in a pressure myograph (Living System Instrumentation) and incubated in calcium-free Krebs solution containing 2 mmol/L EGTA for analysis of passive structure, as previously described.²⁵ Cross-sectional area (CSA) and wall:lumen ratio were analyzed in pressurized mesenteric resistance arteries (80 mmHg).

Vascular Reactivity Studies

Rings from second-order mesenteric resistance arteries were mounted (Danysh MyoTechnology) for isometric tension recordings with PowerLab software (AD Instruments). Rings were placed under a resting tension of 2 mN in tissue baths containing warmed (37°C), aerated (95% O₂, 5% CO₂) standard physiological saline solution (in mmol/L: 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.17 MgSO₄, 0.03 EDTA, 1.6 CaCl₂, 14.9 NaHCO₃, 1.18 KH₂PO₄, and 5.5 glucose). Administration of 10 µmol/L phenylephrine was used to test arterial viability, and the presence of intact endothelium was verified by acetylcholine (1 µmol/L)-induced relaxation in vessels contracted with phenylephrine 1 µmol/L. Concentration-response curves for phenylephrine,

acetylcholine, and sodium nitroprusside were performed. In a set of experiments, mesenteric resistance arteries from WT mice were preincubated for 2 hours with 2.5 ng/mL IL-1β.

Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total mRNA was extracted from mice mesentery beds (Trizol Plus, Invitrogen, Carlsbad, CA), purified with RNeasy spin columns, and eluted from the column in 30 µL diethylpyrocarbonate-treated water, and the concentration was established with a NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). cDNA was generated by real-time polymerase chain reaction with SuperScript III (Invitrogen) from 400 ng total RNA. The gene targets used were vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1; Mm01320970_m1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; Mm00516023_m1), and GAPDH (4352339E) as a housekeeping control. The relative mRNA expressions (target gene/GAPDH, housekeeping gene) were calculated by $\Delta\Delta C_t$ method, and the results were reported as arbitrary units expressed relative to control mice.

Vascular Inflammatory Response: Macrophage Adhesion

Adapted from our previous work,²⁶ the adhesion assay was performed in a 24-well plate coated with 4% agarose. Aortic rings (5 mm) were cleaned and opened longitudinally. The vascular segments were positioned with the endothelium side up in the solid agarose surface (1 segment per well), fixed with sharp-pointed pins, and kept in F12 medium at 37°C. Bone marrow-derived macrophage (BMDM) adherent cells were cultured in RPMI supplemented with 30% L929 cell-conditioned medium and 20% FBS. For cell fluorescent labeling, macrophages (10⁵ cells/mL) were suspended in 1% BSA-supplemented PBS containing 1 µmol/L F4/80 (Molecular Probes) and incubated for 20 minutes at 37°C. Labeled macrophages were washed twice with PBS and suspended in Krebs solution. Fluorescence-labeled cells (10⁵ cells per well) were then added to the wells containing the vascular segments and were allowed to adhere for 30 minutes at 37°C in 5% CO₂. Nonadherent cells were removed by gentle washing with prewarmed Krebs solution. The number of adherent cells was counted with fluorescence microscopy. Four fields were evaluated per segment.

Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells

Male WT mice were anesthetized with a mixture of isoflurane 2% and O₂, and the peritoneal cavity was washed with 5 mL PBS containing EDTA (0.01g/mL). The 5-mL lavage was centrifuged at 12000g for 10 minutes to obtain the cell pellets, which contained only leukocytes.²⁷ These pellets were washed 3 times and frozen at -80°C for future analyses.

BMDM Isolation and Stimulation

BMDMs from WT and *NLRP3*^{-/-} mice were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mmol/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.05 mol/L 2-mercaptoethanol, and macrophage colony-stimulating factor (20 ng/mL) for 6 days.²⁸

After 7 days, BMDMs were incubated with aldosterone (0.1 µmol/L) for 4 to 8 hours and with 500 ng/mL ultrapure

lipopolysaccharides (InvivoGen tlr-pekips) for 6 hours and then stimulated with 20 $\mu\text{mol/L}$ nigericin for 40 minutes (Sigma-Aldrich). The combination of lipopolysaccharides plus nigericin is considered a classic stimulus for NLRP3 inflammasome activation. To analyze whether aldosterone activates the NLRP3 inflammasome by itself, cells were stimulated with lipopolysaccharides (6 hours)+aldosterone (2 hours) and aldosterone (6 hours)+nigericin (40 minutes). Gene expression of NLRP3 (Mm00840904_m1) and IL-1 β (Mm00434228_m1) was determined by real-time polymerase chain reaction. To determine the contribution of nuclear factor- κB (NF- κB) to aldosterone-induced NLRP3 and IL-1 β gene expression, aldosterone incubation (4 and 6 hours) was also performed in the presence of an NF- κB inhibitor (pyrrolidine dithiocarbamate 100 $\mu\text{mol/L}$).

Western Blot Analysis

Total protein was extracted from peritoneal cavity cells and from 5×10^6 BMDM lysate or 5×10^6 cultured human leukocytes. The supernatants from cells were also collected. Cells were homogenized in 50 mmol/L Tris/HCl (pH 7.4) lysis buffer (containing 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.1% SDS, 2 mmol/L sodium orthovanadate [Na_3VO_4], 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 $\mu\text{g/mL}$ pepstatin A, 1 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, and 1 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin). Total protein was cleared by centrifugation at 12000g for 10 minutes, and the pellet was discarded. Proteins (25 μg) were separated by electrophoresis on a polyacrylamide gel (12%) and transferred to Immobilon-P polyvinylidene fluoride membranes. Nonspecific binding sites were blocked with 5% skim milk or 1% BSA in Tris-buffered saline solution with Tween for 1 hour at 24°C. Membranes were then incubated with specific antibodies overnight at 4°C. Antibodies were as follows: anti-NLRP3 (R&D Systems), anti-caspase-1 (Imgenex), and anti-IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology). Antibody to β -actin (Sigma) was used as an internal housekeeping control for animal samples. After incubation with secondary antibodies, the enhanced chemiluminescence luminol reagent (GE Healthcare) was used for antibody detection.

NF- κB Activation

To analyze whether aldosterone contributes to the priming process of NLRP3 inflammasome, we used the NF- κB luciferase-stable RAW264.7 cell line. Cells were stimulated with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ aldosterone for 2 to 6 hours or with 500 ng/mL ultrapure lipopolysaccharides used as a positive control. Cells were then lysed, and luciferase activity was measured with the Luciferase Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions.

MR Cytosolic and Nuclear Fractions

To evaluate nuclear accumulation of MRs, BMDMs were stimulated with aldosterone (0.1 $\mu\text{mol/L}$) for 4 and 6 hours. Nuclear protein extracts were obtained with a nuclear extract kit (Active Motif), according to the manufacturer's protocol. Western blot was used to measure MR expression (Abcam) in cytosolic and nuclear fractions. β -Actin expression (antibody from Sigma) was used as an internal housekeeping control. Values were obtained by densitometry with ImageJ software (National Institutes of Health).

Human Leukocytes Isolation and Response to Aldosterone Stimulation

Human leukocytes were obtained from heparinized venous blood (10 mL) of healthy subjects and isolated by Percoll gradient, as previously described.⁸ A total of 5×10^6 leukocytes were seeded per well. After 12 hours, leukocytes were primed with 500 ng/mL ultrapure lipopolysaccharides (InvivoGen tlr-pekips) for 6 hours and then stimulated with 20 $\mu\text{mol/L}$ nigericin (Sigma-Aldrich) for 40 minutes, which was used as a positive control. In the absence of FBS, a total of 5×10^6 BMDM cells were stimulated with aldosterone (0.1 $\mu\text{mol/L}$) for 6 and 8 hours.

Caspase-1 Activity—FAM-FLICA Assay

BMDMs cells were stained for 1 hour with a FAM-FLICA caspase-1 assay (FAM-YVAD-FMK) kit (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN) according to the manufacturer's instructions. Active caspase-1 was then measured by flow cytometry. Data were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Detection of Mitochondrial Superoxide

BMDM cells were labeled with MitoSOX Red (5 $\mu\text{mol/L}$; Life Technologies) to detect mitochondrial superoxide. Mitochondrial ROS were measured by flow cytometry. The data were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Primary Hyperaldosteronism in Humans

To analyze whether high aldosterone levels also activate NLRP3 inflammasome in human leukocytes, blood samples were taken from patients diagnosed with hyperaldosteronism with Percoll gradient methodology. The procedure was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo.

Hyperaldosteronism was diagnosed by the ratio of aldosterone to renin and confirmed by the saline infusion test. Reference values are shown in [Table 1](#) in the [online-only Data Supplement](#). NLRP3 activation components were measured in polymorphonuclear cells by Western blot, and IL-1 β was measured in serum by ELISA. Age-matched healthy volunteers were used as controls, and samples from hypertensive patients were also used.

Statistical Analysis

For comparisons of multiple groups, 2-way ANOVA followed by the Bonferroni posttest was used. The differences in values obtained for 2 different groups were determined with the Student *t* test. For comparison of IL-1 β levels in serum from humans, the Welch modified *t* test for unequal variances was used. Contraction to phenylephrine is expressed as percentage of KCl-induced response. The relaxation in response to acetylcholine and sodium nitroprusside is expressed as a percentage of contraction induced by phenylephrine. The individual concentration-response curves were fitted by nonlinear regression analysis. pD_2 (defined as the negative logarithm of the EC_{50} values) and maximal response (Emax) were determined.

Figure 1. Interleukin (IL)-1 receptor (IL-1R) is involved in aldosterone (Aldo)-induced vascular damage.

A, Constrictor responses to phenylephrine (Phe) and **(B)** relaxation response to acetylcholine (ACh) in mesenteric arteries from C57BL6/J mice incubated with IL-1 β (2.5 ng/mL) for 2 hours (n=5 mice per group). **C**, IL-1 β plasma levels in C57BL6/J mice infused with Aldo (WT+Aldo) or vehicle (WT). **(D)** Phe-induced constriction and **(E)** relaxation responses to ACh in mesenteric arteries from C57BL6/J and IL-1R $^{-/-}$ mice infused with Aldo (WT+Aldo and IL-1R $^{-/-}$ +Aldo, respectively) or vehicle (WT and IL-1R $^{-/-}$, respectively; n=4–6 mice per group). **F**, Vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1) and **(G)** intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA expression in mesentery isolated from WT+Aldo and IL-1R $^{-/-}$ +Aldo or WT and IL-1R $^{-/-}$ mice (*Continued*)

Analyses were performed with Prism 5.0 software (GraphPad). A difference was considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS

IL-1 β Is Critical in Aldosterone-Induced Vascular Damage

Continuous infusion of aldosterone for 14 days in mice promoted an important vascular dysfunction, characterized by increased vascular contractility to phenylephrine and decreased endothelium-dependent vasodilation to acetylcholine (Figure 1A and 1B in the online-only Data Supplement). Moreover, aldosterone infusion markedly increased the expression of VCAM-1 and ICAM-1 in the mesenteric bed (Figure 1C and 1D in the online-only Data Supplement) and the number of adherent macrophages in the aorta (Figure 1E in the online-only Data Supplement). Aldosterone also induced vascular remodeling characterized by increased CSA and wall:lumen ratio (Figure 1F and 1G in the online-only Data Supplement). Aldosterone infusion produced a small increase in the systolic BP (SBP) in C57BL/6 mice (Figure 1H in the online-only Data Supplement). Aldosterone did not change sodium nitroprusside-induced vascular relaxation (Figure 1I in the online-only Data Supplement).

Considering that proinflammatory cytokines, particularly IL-1 β , induce vascular dysfunction,^{29–31} we investigated whether IL-1 β is critical to aldosterone-induced vascular damage. Mesenteric resistance arteries incubated with IL-1 β exhibited increased phenylephrine-induced contractions and decreased acetylcholine-induced relaxation (Figure 1A and 1B). Aldosterone infusion in WT mice increased IL-1 β levels, as determined by ELISA (Figure 1C). IL-1R $^{-/-}$ mice infused with aldosterone were completely protected against aldosterone-induced vascular dysfunction; that is, they did not exhibit increased vascular contractions to phenylephrine or decreased vascular relaxation to acetylcholine (Figure 1D and 1E). IL-1R deletion also prevented aldosterone-induced increased vascular VCAM-1 and ICAM-1 gene expression (Figure 1F and 1G). In addition, aldosterone-treated IL-1R $^{-/-}$ mice exhibited a lower number of adherent macrophages in aortic segments compared with WT mice treated with aldosterone (Figure 1H). IL-1R $^{-/-}$ mice did not develop vascular remodeling in response to aldosterone infusion, which was clearly observed in WT mice (Figure 1I and 1J). Last, IL-1R $^{-/-}$ mice were protected

against an aldosterone-induced increase in SBP (Figure 1K).

Caspase-1 Is Involved in Aldosterone-Induced Vascular Damage

Because activation of caspase-1 induces processing and secretion of IL-1 β ,¹² aldosterone-induced vascular abnormalities were also determined in Casp-1 $^{-/-}$ mice. Caspase-1 deletion partially blunted aldosterone-induced hypercontractility to phenylephrine and prevented decreased vascular relaxation to acetylcholine (Figure 2A and 2B). The lack of caspase-1 prevented the effects of aldosterone in the expression of the inflammatory markers VCAM-1 and ICAM-1 and in the adherence of macrophages to aortic segments (Figure 2C–2E). Aldosterone-induced vascular remodeling, represented by increased CSA and wall:lumen ratio, and increased SBP were attenuated in Casp-1 $^{-/-}$ mice (Figure 2F–H).

NLRP3 Plays an Essential Role in Aldosterone-Induced Vascular Damage

Caspase-1 contributes to innate immunity through the assembly of NLRP3 inflammasome, which has been associated with several inflammatory and cardiovascular diseases.^{11,20–22,32} To evaluate whether NLRP3 is involved in aldosterone-induced vascular damage, NLRP3 $^{-/-}$ mice were infused with aldosterone. NLRP3 deletion also partially prevented the hypercontractility to phenylephrine and abrogated impaired vascular relaxation to acetylcholine in aldosterone-treated mice (Figure 3A and 3B). NLRP3 $^{-/-}$ mice presented lower VCAM-1 and ICAM-1 gene expression and number of adherent macrophages in aortic segments in response to aldosterone (Figure 3C–3E). NLRP3 $^{-/-}$ mice were also protected from aldosterone-induced vascular remodeling (CSA and wall:lumen ratio) and high SBP (Figure 3F–3H). Taken together, these results indicate that NLRP3 inflammasome plays a key role in aldosterone-induced vascular abnormalities.

Inflammasome Is Activated in Response to Aldosterone

To confirm that aldosterone activates the inflammasome platform and that NLRP3 is involved in this activation,

Figure 1 Continued. (n=5 mice per group). **H**, Adherent macrophages (red) in aortic segments from WT+Aldo and IL-1R $^{-/-}$ +Aldo or WT and IL-1R $^{-/-}$ mice (n=5 mice per group). **I**, Wall:lumen ratio and **J** cross-sectional area (CSA) parameters in isolated mesenteric segments from WT+Aldo and IL-1R $^{-/-}$ +Aldo or WT and IL-1R $^{-/-}$ mice measured with a pressure myograph (n=4–6 mice per group). **K**, Systolic blood pressure in WT and IL-1R $^{-/-}$ mice infused with Aldo (WT+Aldo; IL-1R $^{-/-}$ +Aldo) or vehicle (WT; IL-1R $^{-/-}$). Emax and pD₂ values were determined in the concentration-response curves to Phe and ACh. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni posttest was used for comparisons of multiple groups, whereas for 2 different groups, the Student *t* test was used. Values are reported as mean $\pm$ SEM. \$ $P < 0.05$ vs without IL-1 β . * $P < 0.05$ vs WT mice.

BMDMs from WT and *NLRP3*^{-/-} mice were stimulated with aldosterone. Aldosterone increased mitochondrial ROS production (Figure 4A and 4B). Caspase-1 activation was measured by Western blot in the lysate of BMDMs and by FLICA. Aldosterone (for 6 and 8 hours) increased

cleaved caspase-1, although not to levels observed in the positive control (lipopolysaccharides+nigericin). BMDMs from *NLRP3*^{-/-} mice averted caspase-1 activation (Figure 4C and 4D). Lipopolysaccharides+nigericin, the positive control, increased IL-1 β levels in the superna-

Figure 2. Caspase-1 is involved in aldosterone (Aldo)-induced vascular damage.

A, Constrictor responses to phenylephrine (Phe) and **(B)** relaxation responses to acetylcholine (ACh) in mesenteric arteries from in C57BL6/J and *Casp-1*^{-/-} mice infused with Aldo (WT+Aldo and *Casp-1*^{-/-}+Aldo, respectively) or vehicle (WT and *Casp-1*^{-/-}, respectively; n=6–7 mice per group). **C**, Vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1) and **(D)** intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA expression, determined by quantitative real-time polymerase chain reaction, in mesentery isolated from WT+Aldo and *Casp-1*^{-/-}+Aldo or WT and *Casp-1*^{-/-} mice (n=5 mice per group). **E**, Adherent macrophages (red) in aortic segments from WT+Aldo and *Casp-1*^{-/-}+Aldo or WT and *Casp-1*^{-/-} mice analyzed by fluorescence microscopy (n=5 mice per group). **F**, Cross-sectional area (CSA) and **(G)** wall:lumen ratio parameters in isolated mesenteric segments from WT+Aldo and *Casp-1*^{-/-}+Aldo or WT and *Casp-1*^{-/-} mice measured with a pressure myograph (n=5 mice per group). **H**, Systolic blood pressure in WT and *Casp-1*^{-/-} mice infused with Aldo (WT+Aldo; *Casp-1*^{-/-}+Aldo) or vehicle (WT; *Casp-1*^{-/-}). Emax and pD₂ values were determined in the concentration-response curves to Phe and ACh. Values are reported as mean±SEM. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni posttest was used for comparisons of multiple groups. *P<0.05 vs WT mice. #P<0.05 vs *Casp-1*^{-/-} mice treated with aldosterone.

Figure 3. NLRP3 is involved in aldosterone (Aldo)-induced vascular damage.

A, Constrictor responses to phenylephrine (Phe) and **(B)** relaxation responses to acetylcholine (ACh) in mesenteric arteries from C57BL6/J and *NLRP3*^{-/-} mice infused with Aldo (WT+Aldo and *NLRP3*^{-/-}+Aldo, respectively) or vehicle (WT and *NLRP3*^{-/-}, respectively; *n*=6–7 mice per group). **C**, Vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1) and **(D)** intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA expression, determined by quantitative real-time polymerase chain reaction, in mesentery isolated from WT+Aldo and *NLRP3*^{-/-}+Aldo or WT and *NLRP3*^{-/-} mice (*n*=5 mice per group). **E**, Adherent macrophage (red) in aortic segments from WT+Aldo and *NLRP3*^{-/-}+Aldo or WT and *NLRP3*^{-/-} mice analyzed by fluorescence microscopy (*n*=5 mice per group). **F**, Wall:lumen ratio and **(G)** cross-sectional area (CSA) parameters in isolated mesenteric segments from WT+Aldo and *NLRP3*^{-/-}+Aldo or WT and *NLRP3*^{-/-} mice measured with a pressure myograph (*n*=5 mice per group). **H**, Systolic blood pressure in WT and *NLRP3*^{-/-} mice infused with Aldo (WT+Aldo; *NLRP3*^{-/-}+Aldo) or vehicle (WT; *NLRP3*^{-/-}). Emax and pD₂ values were determined in the concentration-response curves to Phe and ACh. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni posttest was used for comparisons of multiple groups. Values are reported as mean±SEM. **P*<0.05 vs WT mice. #*P*<0.05 vs *NLRP3*^{-/-} mice treated with Aldo.

tant, measured by ELISA and Western blot. Aldosterone for 6 and 8 hours also enhanced, although less than lipopolysaccharides+nigericin, IL-1β levels in the supernatant (Figure 4E and 4F). *NLRP3* deletion prevented lipo-

polysaccharides+nigericin- and aldosterone-induced IL-1β production by BMDMs (Figure 4E and 4F). Our data suggest that aldosterone induces *NLRP3* inflammasome activation, which may be mediated by oxidative stress.

Figure 4. Aldosterone increases reactive oxygen species (ROS) generation and activates NLRP3 inflammasome in bone marrow-derived macrophages (BMDMs).

A, ROS production by mitochondria in C57BL/6/J and *NLRP3*^{-/-} BMDMs treated with aldosterone (0.1 μmol/L) for (Continued)

Aldosterone seems to activate NLRP3 inflammasome by genomic mechanisms because the aldosterone-induced increase in caspase-1 activity (Figure 4Ia–4Id in the online-only Data Supplement) was correlated with increased MR translocation to the nucleus (Figure 4Ie in the online-only Data Supplement).

Aldosterone Increases NLRP3 and IL-1 β Expression Through NF- κ B Activation

Inflammasome activation is a 2-step process. The first step, the priming process, leads to the expression of NLRP3 and pro-IL-1 β through activation of NF- κ B. To analyze whether aldosterone induces the first signal for NLRP3 inflammasome activation, macrophages were submitted to 2 different stimuli (aldosterone+nigericin and lipopolysaccharides+aldosterone; lipopolysaccharides+nigericin was used as a positive control). Both stimuli, aldosterone+nigericin and lipopolysaccharides+aldosterone, increased NLRP3 inflammasome activation, measured by FLICA and flow cytometry (Figure 4Va and 4Vb in the online-only Data Supplement). Aldosterone also triggered NF- κ B activation after 4 hours of incubation (Figure 4Vc in the online-only Data Supplement). In addition, aldosterone increased NLRP3 and IL-1 β gene expression, and pyrrolidine dithiocarbamate, an NF- κ B inhibitor, prevented aldosterone-induced NLRP3 and IL-1 β gene expression (Figure 4Vd and 4Ve in the online-only Data Supplement).

NLRP3 in the Immune System Is Key to Aldosterone-Induced Vascular Damage

Considering the link between the immune system and cardiovascular diseases, we analyzed whether aldosterone treatment activates NLRP3 inflammasome in cells from the peritoneal cavity (peritoneal macrophages) in WT mice. Aldosterone infusion increased NLRP3 protein expression, caspase-1 activity, and mature IL-1 β in peritoneal cavity cells (Figure 5A–5C). Although our data clearly show that vascular damage induced by aldosterone depends on NLRP3 inflammasome activation and that aldosterone activates inflammasome in immune cells through NLRP3, it was not clear whether NLRP3 inflammasome activation in the immune system or in the vasculature contributes to vascular damage

induced by aldosterone. To address this question, we transplanted the bone marrow from *NLRP3*^{-/-} mice into WT mice. Aldosterone increased contractions to phenylephrine and decreased vascular relaxation to acetylcholine in WT→WT mice. However, aldosterone-induced changes in vascular reactivity were partially abrogated in *NLRP3*^{-/-}→WT mice (Figure 5D and 5E). Furthermore, *NLRP3*^{-/-}→WT mice were moderately protected from aldosterone-induced vascular inflammation, determined by VCAM-1 and ICAM-1 mRNA expression and adherence of macrophages to aortic segments (Figure 5F–5H). *NLRP3*^{-/-}→WT mice treated with aldosterone exhibited attenuated increases in CSA and wall:lumen ratio compared with aldosterone-infused WT→WT mice (Figure 5I–5J). Overall, these findings suggest that NLRP3 inflammasome in the immune system has a very important role in vascular damage induced by aldosterone.

Hyperaldosteronism and Hypertension Trigger NLRP3 Inflammasome Activation in Isolated Human Polymorphonuclear Cells

Hyperaldosteronism presents a straight relationship with vascular damage. To determine whether patients with hyperaldosteronism exhibit NLRP3 inflammasome activation, polymorphonuclear cells from a patient diagnosed with primary hyperaldosteronism were isolated (Table 1 in the online-only Data Supplement), and NLRP3 activation was assessed. In addition, serum IL-1 β levels were determined in these patients. Hyperaldosteronism increased NLRP3 protein expression, caspase-1 activation, and mature IL-1 β in human leukocytes. Serum levels of IL-1 β levels were also increased in patients with hyperaldosteronism compared with healthy human volunteers (Figure 6A and 6B). Polymorphonuclear cells from hypertensive patients that do not exhibit increased aldosterone levels also exhibited increased NLRP3 inflammasome activity (Figure 6C).

To confirm the potential ability of aldosterone to activate NLRP3 inflammasome, leukocytes were isolated from a healthy human volunteer, seeded in 24-well plates, and stimulated with aldosterone, with lipopolysaccharides+nigericin used as a positive control. In human leukocytes, aldosterone increased NLRP3 protein expression, triggered caspase-1 activation, and increased mature IL-1 β in the lysate and in the supernatant (Figure 6D).

Figure 4 Continued. 6 and 8 hours by flow cytometry analysis. **B**, Quantification of the average of arbitrary units (A.U) of MytoSx in C57BL6/J and *NLRP3*^{-/-} BMDMs. **C**, Caspase-1 activity in C57BL6/J and *NLRP3*^{-/-} BMDMs treated with aldosterone (0.1 μ mol/L) for 6 and 8 hours by flow cytometry analysis. **D**, Quantification of the average percentages of FAM-YVAD⁺ in C57BL6/J and *NLRP3*^{-/-} BMDMs. **E**, Immunoblotting for caspase-1 p20 and interleukin (IL)-1 β p17 in cell-culture supernatants (SN) and cell lysates (Lys) in BMDMs stimulated for 6 hours with lipopolysaccharides (LPS; 500 ng/mL) plus 20 μ mol/L nigericin (Nig) for 1 hour or with aldosterone (0.1 μ mol/L) for 6 hours. **F**, IL-1 β production measured by ELISA in C57BL6/J and *NLRP3*^{-/-} BMDMs stimulated for 6 hours with LPS (500 ng/mL) plus 20 μ mol/L Nig for 1 hour or with aldosterone (0.1 μ mol/L) for 6 hours (n=5 per group). One- or 2-way ANOVA followed by the Bonferroni posttest was used for comparisons of multiple groups. Values are reported as mean $\pm$ SEM. **P*<0.05 vs vehicle. #*P*<0.05 vs LPS+Nig.

Figure 5. NLRP3 inflammasome in bone marrow–derived cells is involved on aldosterone (Aldo)-induced vascular damage.

WT→WT and *NLRP3*^{-/-}→WT chimeric mice were produced, and Aldo infusion was performed. Immunoblotting for (A) NLRP3, (B) caspase-1 p20, and (C) interleukin (IL)-1β p17 in peritoneal cavity cells from C57BL6/J mice treated with Aldo (WT+Aldo) or vehicle (WT). D, Constrictor responses to phenylephrine (Phe) and (E) relaxation responses to acetylcholine (ACh) in mesenteric arteries from WT→WT and *NLRP3*^{-/-}→WT mice infused with aldosterone (WT→WT+Aldo and *NLRP3*^{-/-}→WT+Aldo) or vehicle (WT→WT; n=5–7 mice per group). F, Vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1) and (G) intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA expression, determined by quantitative real-time polymerase chain reaction, in mesentery isolated from WT→WT, WT→WT+Aldo, and *NLRP3*^{-/-}→WT+Aldo mice (n=5 mice per group). H, Adherent macrophage (red) in aortic segments from WT→WT, WT→WT+Aldo, and *NLRP3*^{-/-}→WT+Aldo mice analyzed by fluorescence microscopy (n=5 mice per group). (Continued)

Figure 6. Hyperaldosteronism and hypertension activate NLRP3 inflammasome.

A, Interleukin (IL)-1 β production measured by ELISA in healthy human volunteers (controls) and in patients with hyperaldosteronism (H). **B**, Immunoblotting for NLRP3, caspase-1 p20, and IL-1 β p17 in polymorphonuclear cells (PMNCs) from a healthy human volunteer (V; control), a patient with hyperaldosteronism, and **(C)** a hypertensive patient. **D**, Immunoblotting for caspase-1 p20 and IL-1 β p17 in cell-culture supernatants (SN) and cell lysates (Lys) of PMNCs from a healthy human volunteer stimulated for 6 hours with lipopolysaccharides (LPS; 500 ng/mL) plus 20 μ mol/L nigericin (Nig) for 40 minutes or with aldosterone (0.1 μ mol/L) for 6 and 8 hours (n=6–16 per group). The Welch modified t test for unequal variances was used to analyze the IL-1 β levels. Values are reported as mean $\pm$ SEM. * P <0.05 versus control.

DISCUSSION

Our data demonstrate for the first time that NLRP3 inflammasome in bone marrow-derived cells plays a crucial role in aldosterone-induced vascular damage by processing and secreting IL-1 β . In addition, our clinical studies indicate that vascular damage associated with hyperaldosteronism might be dependent on NLRP3 inflammasome activation in immune cells. Because NLRP3 inflammasome activation in immune cells was also found in hypertensive patients with normal aldosterone levels, it is possible that aldosterone-induced NLRP3 inflammasome activation is mediated through high BP.

It is well established that aldosterone leads to vascular damage^{1,3,4,33} and to small to mild increases in BP levels^{4,34,35} in mice. Clinical and experimental studies have shown that salt and aldosterone independently induce vascular abnormalities and that aldosterone plus salt intake accelerates organ damage or, more specifically, vascular damage,^{36–39} possibly through inflammatory-related processes.^{1,40} In the present study, we have not addressed whether salt directly induces or contributes to aldosterone-induced NLRP3 inflammasome activation,

but our study is in line with previous reports because aldosterone triggered a minor increase in SBP.

The immune system, through innate and adaptive immune responses, modulates vascular function in different conditions.^{4,7,9,10,41–43} Long-term angiotensin II infusion in control mice impairs endothelium-dependent vasodilation. In contrast, angiotensin II causes minimal perturbation of endothelium-dependent vasodilation in *Rag1*^{-/-} mice (knockout mice for mature B and T lymphocytes).⁹ Furthermore, adoptive transfer of T-regulatory lymphocytes, but not T-effector cells, blunts angiotensin II-induced vascular damage.⁷ Last, similar to T-regulatory lymphocyte effects on angiotensin II-induced vascular injury, T-regulatory lymphocyte adoptive transfer also prevents aldosterone-induced vascular damage.⁴ B and T lymphocytes are the major cellular components of the adaptive immune response, whereas T-regulatory lymphocytes are considered suppressors of the innate and adaptive immune responses.^{4,41,42} Evidence indicates that innate immune responses control vascular function through Toll-like receptors, a subfamily of pattern recognition receptors.^{44,45} Circulating mtDNA and impaired DNase activity lead to activation of the innate immune system through Toll-like receptor 9 and

Figure 5 Continued. **I**, Cross-sectional area (CSA) and **(J)** wall:lumen ratio parameters in isolated mesenteric segments from WT $\rightarrow$ WT, WT $\rightarrow$ WT+Aldo, and *NLRP3*^{-/-} $\rightarrow$ WT+Aldo mice measured with a pressure myograph (n=5 mice per group). Emax and pD₂ values were determined in the concentration-response curves to Phe and ACh. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni posttest was used for comparisons of multiple groups. Values are reported as mean $\pm$ SEM. * P <0.05 vs *NLRP3*^{-/-} $\rightarrow$ WT+Aldo. # P <0.05 vs WT $\rightarrow$ WT. & P <0.05, WT $\rightarrow$ WT+Aldo vs *NLRP3*^{-/-} $\rightarrow$ WT+Aldo on pD₂ value.

contribute to vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats.⁴⁵ In addition, treatment with a neutralizing anti-Toll-like receptor4 reduces vascular injury in C57BL6/J mice infused with angiotensin II, likely by inhibition of oxidative stress-related mechanisms.⁴⁶ Although various studies have shown a link between cardiovascular disease and the immune system, the involvement of NLRP3 inflammasome on vascular dysfunction has not been clarified.

NLRP3 forms a multiprotein inflammasome complex that activates caspase-1 and leads to the maturation of several key proinflammatory cytokines, including IL-1 β and IL-18. Mitochondrial ROS are one of the main activators of NLRP3 inflammasome.^{11,47} There is indirect evidence that NLRP3 inflammasome activity plays a role in the development of vascular damage. For example, mice with type 1 diabetes mellitus treated with anakinra (IL-1R antagonist) are protected from vascular dysfunction.²⁹ Anakinra treatment improves vascular and left ventricular function in patients with rheumatoid arthritis,⁴⁸ and *Casp-1*^{-/-} mice with pristine-induced murine lupus do not exhibit vascular damage.⁴⁹ In addition, endothelial dysfunction in obese Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats seems to occur through NLRP3 activation and mitochondrial dysfunction.¹⁶ Last, patients with coronary artery disease present high NLRP3 RNA expression, which is positively correlated with IL-1 β and IL-18 levels.⁵⁰

Few studies have shown a direct effect of inflammasome activation on specific organ injury. The inflammasome assembly in mouse heart under acute myocardial infarction causes additional loss of functional myocardium, leading to heart failure.²² Mice deficient in ASC and *Casp-1* present diminished inflammatory responses and subsequent injuries, including infarct development, myocardial fibrosis, and dysfunction induced by myocardial ischemia/reperfusion injury, which depend on bone marrow and myocardial resident cells.²¹ In addition, *NLRP3*^{-/-} mice present improved cardiac function and reduced hypoxic damage when subjected to global ischemia and reperfusion compared with WT mice.¹⁹

Uninephrectomized mice treated with deoxycorticosterone acetate and saline, a model of mineralocorticoid hypertension, present inflammasome activation in the kidney, which is associated with increased collagen deposition and inflammatory markers. ASC knockout mice are protected against these abnormalities. In addition, NLRP3 antagonist (MCC950) treatment blunts deoxycorticosterone acetate and saline-induced hypertension and kidney inflammation.¹⁸ Uninephrectomized WT mice infused with aldosterone present increased inflammasome activation in the kidney, which is abrogated by eplerenone treatment (MR antagonist), suggesting that aldosterone activates the inflammasome through MR. Moreover, the lack of ASC gene prevents increased renal inflammation and remodeling, which are dependent of bone marrow-derived cells. Completing this interesting finding, macrophages primed with lipopolysaccharides

and stimulated with aldosterone present augmented inflammasome activation, mediated by mitochondrial ROS.¹⁵ Our study, at least in isolated macrophages, is in line with these findings. Although Kadoya et al¹⁵ addressed the inflammasome activation in the development of renal fibrosis in mice, the involvement of NLRP3 on aldosterone effects was indirectly assessed.

Using knockout mice for NLRP3, Casp-1, and IL-1R, the present study shows that aldosterone activates NLRP3 inflammasome, leading to vascular dysfunction, inflammation, and remodeling that are dependent on IL-1R activation, placing the NLRP3 inflammasome as the major platform in aldosterone-induced vascular damage. Protective vascular effects associated with the deletion of inflammasome components do not seem to depend on BP differences, although the small increase in BP produced by aldosterone in WT mice was not observed in mice deficient in NLRP3 and inflammasome components. In addition, aldosterone-induced vascular dysfunction occurs through NLRP3 inflammasome activation in cells from the bone marrow. In BMDMs, aldosterone seems to induce both the first and second signals necessary for inflammasome activation. The priming signal leads to NF- κ B activation, whereas ROS may be the second signal. Our data suggest that the immune system has a major impact on aldosterone-induced abnormalities of vascular tone and structure. Of importance, NLRP3 inflammasome activation is observed in patients with hyperaldosteronism and in hypertensive patients who do not exhibit high levels of aldosterone, which places NLRP3 inflammasome as a possible clinical target for these patients.

Our data add one more piece to the puzzle linking cardiovascular diseases and the immune system by showing and reinforcing the role of innate immune responses on vascular injury or, more precisely, on aldosterone-induced vascular disease. We identified NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion as a pivotal pathway that can be targeted for the development of future therapeutic strategies to prevent aldosterone- and hypertension-associated vascular damage.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to V. Dixit (Genentech, USA) for providing the *NLRP3*^{-/-} mice.

SOURCES OF FUNDING

This work was supported by grants from Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior under grant agreement 88887.092495/2015-00; from the São Paulo Research Foundation under grant agreement 2013/08216-2 (Center for Research in Inflammatory Diseases); and from the University of São Paulo NAP-DIN under grant agreement 11.1.21625.01.0.

DISCLOSURES

None.

AFFILIATIONS

From Department of Pharmacology (T.B.-N., N.S.F., C.Z.Z., F.R., I.O.P., V.C.O., K.B.N., R.A.-L., E.C., F.L.M., D.P., J.P.M.L., J.C.A.F., R.C.T.), Department of Physiology (C.A.A.S., R.F.), Department of Biochemistry and Immunology (D.C.), Department of Clinical Medicine, Division of Endocrinology (P.C.E., A.C.M.), and Department of Cell and Molecular Biology (D.S.Z.), Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil; Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil (F.V.P., T.B., N.O.); and Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (S.B.C.).

FOOTNOTES

Received May 5, 2016; accepted October 4, 2016.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024369/-/DC1>.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>.

REFERENCES

- Briet M, Schiffrin EL. Vascular actions of aldosterone. *J Vasc Res*. 2013;50:89–99. doi: 10.1159/000345243.
- Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:261–273. doi: 10.1038/nrneph.2010.30.
- Callera GE, Yogi A, Briones AM, Montezano AC, He Y, Tostes RC, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular proinflammatory responses by aldosterone are mediated via c-Src trafficking to cholesterol-rich microdomains: role of PDGFR. *Cardiovasc Res*. 2011;91:720–731. doi: 10.1093/cvr/cvr131.
- Kasal DA, Barhoumi T, Li MW, Yamamoto N, Zdanovich E, Rehman A, Neves MF, Laurant P, Paradis P, Schiffrin EL. T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury. *Hypertension*. 2012;59:324–330. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.181123.
- De Ciuceis C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM, Schiffrin EL. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2106–2113. doi: 10.1161/01.ATV.0000181743.28028.57.
- Javeshghani D, Barhoumi T, Idris-Khodja N, Paradis P, Schiffrin EL. Reduced macrophage-dependent inflammation improves endothelin-1-induced vascular injury. *Hypertension*. 2013;62:112–117. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01298.
- Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, Neves MF, Paradis P, Schiffrin EL. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*. 2011;57:469–476. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941.
- Mestriner FL, Spiller F, Laure HJ, Souto FO, Tavares-Murta BM, Rosa JC, Basile-Filho A, Ferreira SH, Greene LJ, Cunha FQ. Acute phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:19595–19600. doi: 10.1073/pnas.0709681104.
- Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007;204:2449–2460. doi: 10.1084/jem.20070657.
- Marvar PJ, Thabet SR, Guzik TJ, Lob HE, McCann LA, Weyand C, Gordon FJ, Harrison DG. Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res*. 2010;107:263–270. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217299.
- Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229–265. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132715.
- Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, Gutierrez FR, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni DS. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nat Med*. 2013;19:909–915. doi: 10.1038/nm.3221.
- Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nuñez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:365–398. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 2006;440:228–232. doi: 10.1038/nature04515.
- Kadoya H, Satoh M, Sasaki T, Taniguchi S, Takahashi M, Kashi-hara N. Excess aldosterone is a critical danger signal for inflammasome activation in the development of renal fibrosis in mice. *FASEB J*. 2015;29:3899–3910. doi: 10.1096/fj.15-271734.
- Liu P, Xie Q, Wei T, Chen Y, Chen H, Shen W. Activation of the NLRP3 inflammasome induces vascular dysfunction in obese OLETF rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;468:319–325. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.105.
- Wen H, Ting JP, O'Neill LA. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases: did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol*. 2012;13:352–357. doi: 10.1038/ni.2228.
- Krishnan SM, Dowling JK, Ling YH, Diep H, Chan CT, Ferens D, Kett MM, Pinar A, Samuel CS, Vinh A, Arumugam TV, Hewitson TD, Kemp-Harper BK, Robertson AA, Cooper MA, Latz E, Mansell A, Sobey CG, Drummond GR. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *Br J Pharmacol*. 2016;173:752–765. doi: 10.1111/bph.13230.
- Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen AV, Dahl CP, Askevold ET, Florholmen G, Christensen G, Fitzgerald KA, Lien E, Valen G, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2013;99:164–174. doi: 10.1093/cvr/cvt091.
- Afrasyab A, Qu P, Zhao Y, Peng K, Wang H, Lou D, Niu N, Yuan D. Correlation of NLRP3 with severity and prognosis of coronary atherosclerosis in acute coronary syndrome patients. *Heart Vessels*. 2016;31:1218–1229. doi: 10.1007/s00380-015-0723-8.
- Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123:594–604. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982777.
- Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following

- acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:19725–19730. doi: 10.1073/pnas.1108586108.
23. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR, Ferrara JL. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med*. 2002;8:575–581. doi: 10.1038/nm0602-575.
 24. Duran-Struuck R, Dysko RC. Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009;48:11–22.
 25. McCurley A, Pires PW, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D, Chambon P, Hill MA, Dorrance AM, Mendelsohn ME, Jaffe IZ. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med*. 2012;18:1429–1433. doi: 10.1038/nm.2891.
 26. Bruder-Nascimento T, Callera GE, Montezano AC, He Y, Antunes TT, Nguyen Dinh Cat A, Tostes RC, Touyz RM. Vascular injury in diabetic db/db mice is ameliorated by atorvastatin: role of Rac1/2-sensitive Nox-dependent pathways. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128:411–423. doi: 10.1042/CS20140456.
 27. Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp*. 2010;28:1488. doi: 10.3791/1488.
 28. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol*. 2009;183:6469–6477. doi: 10.4049/jimmunol.0901575.
 29. Vallejo S, Palacios E, Romacho T, Villalobos L, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF. The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:158. doi: 10.1186/s12933-014-0158-z.
 30. Wimalasundera R, Fexby S, Regan L, Thom SA, Hughes AD. Effect of tumour necrosis factor- α and interleukin 1 β on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric resistance arteries *in vitro*. *Br J Pharmacol*. 2003;138:1285–1294. doi: 10.1038/sj.bjp.0705168.
 31. Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased superoxide anion production by interleukin-1 β impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316:42–52. doi: 10.1124/jpet.105.088435.
 32. Peng K, Liu L, Wei D, Lv Y, Wang G, Xiong W, Wang X, Altaf A, Wang L, He D, Wang H, Qu P. P2X7R is involved in the progression of atherosclerosis by promoting NLRP3 inflammasome activation. *Int J Mol Med*. 2015;35:1179–1188. doi: 10.3892/ijmm.2015.2129.
 33. Leibowitz A, Schiffrin EL. Immune mechanisms in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2011;13:465–472. doi: 10.1007/s11906-011-0224-9.
 34. Leibovitz E, Ebrahimián T, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone induces arterial stiffness in absence of oxidative stress and endothelial dysfunction. *J Hypertens*. 2009;27:2192–2200. doi: 10.1097/HJH.0b013e328330a963.
 35. Schreier B, Rabe S, Winter S, Ruhs S, Mildenerberger S, Schneider B, Sibilia M, Gotthardt M, Kempe S, Mäder K, Grossmann C, Gekle M. Moderate inappropriately high aldosterone/NaCl constellation in mice: cardiovascular effects and the role of cardiovascular epidermal growth factor receptor. *Sci Rep*. 2014;4:7430. doi: 10.1038/srep07430.
 36. Acelayado MC, Pimenta E, Calhoun DA. Salt and aldosterone: a concert of bad effects. *Hypertension*. 2010;56:804–805. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.160960.
 37. Fujita T. Mechanism of salt-sensitive hypertension: focus on adrenal and sympathetic nervous systems. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25:1148–1155. doi: 10.1681/ASN.2013121258.
 38. Drenjančević-Perić I, Jelaković B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res*. 2011;34:1–11. doi: 10.1159/000320387.
 39. Mizuno M, Downey RM, Mitchell JH, Auchus RJ, Smith SA, Vongpatanasin W. Aldosterone and salt loading independently exacerbate the exercise pressor reflex in rats. *hypertension*. 2015;66:627–633. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05810.
 40. Dmitrieva NI, Burg MB. Elevated sodium and dehydration stimulate inflammatory signaling in endothelial cells and promote atherosclerosis. *PLoS One*. 2015;10:e0128870. doi: 10.1371/journal.pone.0128870.
 41. Trott DW, Harrison DG. The immune system in hypertension. *Adv Physiol Educ*. 2014;38:20–24. doi: 10.1152/advan.00063.2013.
 42. Harrison DG. The immune system in hypertension. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2014;125:130–38; discussion 138.
 43. Schiffrin EL. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126:267–274. doi: 10.1042/CS20130407.
 44. Thompson JA, Webb RC. Potential role of Toll-like receptors in programming of vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2013;125:19–25. doi: 10.1042/CS20120673.
 45. McCarthy CG, Wenceslau CF, Gouloupoulou S, Ogbi S, Baban B, Sullivan JC, Matsumoto T, Webb RC. Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2015;107:119–130. doi: 10.1093/cvr/cvv137.
 46. Hernanz R, Martínez-Revelles S, Palacios R, Martín A, Cachofeiro V, Aguado A, García-Redondo L, Barrús MT, de Batista PR, Briones AM, Salaices M, Alonso MJ. Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Br J Pharmacol*. 2015;172:3159–3176. doi: 10.1111/bph.13117.
 47. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP. The NLRP3 inflammasome mediates *in vivo* innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*. 2009;30:556–565. doi: 10.1016/j.immuni.2009.02.005.
 48. Ikonomidis I, Lekakis JP, Nikolaou M, Paraskevaidis I, Andreadou I, Kaplanoglou T, Katsimbri P, Skarantavos G, Soucacos PN, Kremastinos DT. Inhibition of interleukin-1 by anakinra improves vascular and left ventricular function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2008;117:2662–2669. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.731877.
 49. Kahlenberg JM, Yalavarthi S, Zhao W, Hodgins JB, Reed TJ, Tsuji NM, Kaplan MJ. An essential role of caspase 1 in the induction of murine lupus and its associated vascular damage. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:152–162. doi: 10.1002/art.38225.
 50. Satoh M, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. NLRP3 inflammasome activation in coronary artery disease: results from prospective and randomized study of treatment with atorvastatin or rosuvastatin. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126:233–241. doi: 10.1042/CS20130043.

NLRP3 Inflammasome Mediates Aldosterone-Induced Vascular Damage

Thiago Bruder-Nascimento, Nathanne S. Ferreira, Camila Z. Zanotto, Fernanda Ramalho, Isabela O. Pequeno, Vania C. Olivon, Karla B. Neves, Rheure Alves-Lopes, Eduardo Campos, Carlos Alberto A. Silva, Rubens Fazan, Daniela Carlos, Fabiola L. Mestriner, Douglas Prado, Felipe V. Pereira, Tarcio Braga, Joao Paulo M. Luiz, Stefany B. Cau, Paula C. Elias, Ayrton C. Moreira, Niels O. Câmara, Dario S. Zamboni, Jose Carlos Alves-Filho and Rita C. Tostes

Circulation. 2016;134:1866-1880; originally published online November 1, 2016;
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024369

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the
World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/134/23/1866>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circ.ahajournals.org/content/suppl/2016/11/01/CIRCULATIONAHA.116.024369.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

SUPPLEMENTARY FIGURE 3

SUPPLEMENTARY FIGURE 4

SUPPLEMENTARY FIGURE 5

Supplementary figure 1. Bone Marrow Transplantation (BMT) in WT mice. Control

WT mice (not exposed to radiation) and BMT mice (exposed to radiation; not injected with bone marrow cells) without treatment with antibiotics. (n=10 per group).

Supplementary figure 2. Aldosterone induces vascular damage. Responses of mesenteric arteries from C57BL6/J mice infused with Aldo (WT+Aldo) or vehicle (WT), in response to **(a)** phenylephrine (Phe) and **(b)** acetylcholine (ACh) (n=5-7 mice per group). **(c)** VCAM-1 and **(d)** ICAM-1 mRNA expression, determined by quantitative RT-PCR, in mesentery isolated from WT and WT+Aldo mice (n=5 mice per group). **(e)** Adherent macrophages (in red) in aortic segments from WT and WT+Aldo mice analyzed by fluorescence microscopy (n=5 mice per group). **(f)** Cross Sectional Area (CSA) and **(g)** wall:lumen (W:L) ratio parameters in isolated mesenteric segments from WT and WT+Aldo mice measured with a pressure myograph (n=5 mice per group). **(h)** Systolic blood pressure in C57BL6/J mice infused with Aldo (WT+Aldo) or vehicle (WT). *P < 0.05 vs. vehicle-treated WT. Emax and pD₂ values were determined in the concentration-response curves to Phe and ACh. Student's t test was used. Values are reported as mean ± s.e.m.

Supplementary figure 3. Aldosterone (600 µg/Kg/day for 14 days) does not change vascular responses to sodium nitroprusside. Vasodilator responses to sodium nitroprusside (SNP) in C57BL6/J mice infused with Aldo (WT+Aldo) or vehicle (WT) (n=5-7 mice per group). Values are reported as mean ± s.e.m.

Supplementary figure 4. Aldosterone activates NLRP3 inflammasome, possibly via genomic effects. **(a)** Caspase-1 activity in C57BL6/J BMDMs treated with vehicle or aldosterone (0.1 μ M) for 4-8 h, by flow cytometry analysis **(a)**, average of FAM-YVAD⁺ in C57BL6/J BMDMs and **b, c, d** representative profiles). **(e)** Representative figure and quantification of the expression of MR receptor in nuclear and cytosolic fractions of BMDMs stimulated with vehicle or aldosterone (0.1 μ M) for 4-6 h (n = 5-8 per group). * P < 0.05 vs. vehicle; One analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's post-test was used for comparisons of multiple groups. Values are reported as mean $\pm$ s.e.m.

Supplementary figure 5. Aldosterone activates NLRP3 inflammasome dependent of NF-kB activation. **(a)** Caspase-1 activity, measured by flow cytometry analysis, in C57BL6/J BMDMs treated for 6 h with LPS (500 ng.ml⁻¹) plus 20 μ M nigericin (Nig) for 1 h – positive control - or for 6 h with LPS (500 ng.ml⁻¹) plus aldosterone (0.1 μ M) for 2 h or aldosterone (0.1 μ M) for 6 h plus 20 μ M nigericin (Nig) for 1 h. **(b)** Representative profiles of FAM-YVAD⁺ in C57BL6/J BMDMs. **(c)** NF-kB activity in luciferase stable RAW264.7 cells treated for 6 h with LPS (500 ng.ml⁻¹) or with aldosterone (0.1 μ M) for 2-6 h. NLRP3 **(d)** and IL-1 β **(e)** mRNA expression in BMDMs stimulated for 6 h with LPS (500 ng.ml⁻¹) or with aldosterone (0.1 μ M) for 4-6 h. * P < 0.05 vs. vehicle; # P < 0.05 vs. LPS+Nig. One or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's post-test was used for comparisons of multiple groups. Values are reported as mean $\pm$ s.e.m.

Supplementary table 1. Reference values of the patients diagnosed with primary hyperaldosteronism

Parameter	Reference Value
<i>Plasma Aldosterone Levels (ng/dL)</i>	>12
<i>PRA ng/dL/mL/h</i>	> 2,5
<i>Aldosterone:PRA ratio</i>	> 20
Pre Saline Infusion	
<i>K⁺ (mEq/L)</i>	3,5 - 5,0
<i>Na⁺ (mEq/L)</i>	135 - 145
<i>Aldosterone (ng/dL)</i>	---
Post Saline Infusion	
<i>K⁺ (mEq/L)</i>	3,5 - 5,0
<i>Na⁺ (mEq/L)</i>	135 - 145
<i>Aldosterone (ng/dL)</i>	<10

Plasma aldosterone and renin levels were measured by radioimmunoassay; Saline infusion: 2 L of saline solution for 4 h; Na⁺ and K⁺ were determined using ion selective electrodes by potentiometry.