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

**PAPEL DA ENDOTELINA-1 NA ATIVAÇÃO DO NLRP3
NO TECIDO MUSCULAR LISO DO CORPO CAVERNOSO**

RAFAEL SOBRANO FAIS

**RIBEIRÃO PRETO
2016**

RAFAEL SOBRANO FAIS

**PAPEL DA ENDOTELINA-1 NA ATIVAÇÃO DO NLRP3 NO
TECIDO MUSCULAR LISO DO CORPO CAVERNOSO**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Rita de Cássia Aleixo Tostes
Passaglia

**Ribeirão Preto
2016**

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Fais, Rafael Sobrano.

Papel da endotelina-1 na ativação do NLRP3 no tecido muscular liso do corpo cavernoso / Rafael Sobrano Fais; orientador: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia – Ribeirão Preto, 2016.

100 f.:il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2016.

1.Endotelina-1. 2. Disfunção erétil. 3. NLRP3. I. Fais, Rafael Sobrano. II. Tostes, Rita de Cássia. III. Carneiro, Fernando Silva. IV. Título.

FAIS, R.S. Papel da endotelina-1 na ativação do NLRP3 no tecido muscular liso do corpo cavernoso. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências (Farmacologia)

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof(a). Dr(a). _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Dedico:

À minha mãe, Ruth Sueli Sobrano Fais, ao meu pai, Clodail Roberto Fais e ao meu irmão Guilherme Sobrano Fais por toda dedicação e incentivo durante toda minha formação.

À minha namorada, Erica das Neves Palotta, por todo apoio e carinho durante todo esse último ano.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro e a Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia, por toda a dedicação, amizade, compreensão, paciência e por todos os ensinamentos.

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

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

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

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

À Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack, minha assessora durante o mestrado, e a Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza, pelas críticas e conselhos ao trabalho.

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

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

Às agências de fomento: CAPES, CNPQ, FAEPA e FAPESP, pois sem a ajuda delas nenhum trabalho seria possível.

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

Resumo

FAIS, R.S. PAPEL DA ENDOTELINA-1 NA ATIVAÇÃO DO NLRP3 NO TECIDO MUSCULAR LISO DO CORPO CAVERNOSO. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Introdução: A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de alcançar ou manter a ereção do pênis para um desempenho sexual satisfatório, contribuindo significativamente para a baixa qualidade de vida e morbidade psicossocial masculina. A endotelina-1 (ET-1), um potente peptídeo vasoconstritor que promove contração lenta e sustentada em células de músculo liso vascular, possui grande importância na fisiopatologia da DE. Diversos estudos mostram que o aumento da expressão de mediadores inflamatórios está intimamente ligado ao desenvolvimento da DE. O inflamassoma é um complexo multiprotéico do sistema imune inato que atua através da ativação da caspase-1 e resulta na maturação de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 β (IL-1 β). O receptor NLRP3 faz parte do inflamassoma e sua ativação leva a clivagem de caspase-1 e consequente secreção de IL-1 β . A ET-1, também possui papel importante na inflamação crônica vascular, mediando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, ainda é desconhecido se a ação pró-inflamatória da ET-1 em células de músculo liso é mediada pela ativação da via do inflamassoma. **Hipótese:** A ET-1 ativa o NLRP3 em células do músculo liso do corpo cavernoso (CMLCC), promovendo alterações na reatividade do corpo cavernoso (CC). **Objetivo:** Avaliar o papel da endotelina-1 na ativação do NLRP3 em CMLCC de camundongos. **Métodos:** CMLCC de camundongos C57BL/6 (WT) e NLRP3^{-/-} foram cultivadas em meio de cultura DMEM acrescido de soro fetal bovino (SFB), 10%, foram pré-incubadas com endotelina-1 nas concentrações de 10⁻⁹, 10⁻⁸ e 10⁻⁷ M, em presença de LPS ou veículo. Avaliamos o efeito da deleção do NLRP3 sobre a reatividade do CC (contratilidade e relaxamento mediante estímulos por campo elétrico e/ou farmacológico). Após, avaliamos o efeito da ET-1 na ativação do NLRP3, nas alterações sobre a reatividade do CC de camundongos WT, e se estas persistiriam nos camundongos NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-}. **Resultados:** As células apresentaram-se fluorescentes para marcação para α -actina e não para Von Willebrand, caracterizando assim que não houve contaminação com células endoteliais. A incubação com a ET-1 10⁻⁷ M por 24 h na presença de LPS ou veículo aumentou a atividade da caspase-1 em CMLCC de camundongos WT e este efeito não ocorreu nas CMLCC de camundongos NLRP3^{-/-}. Não se observou diferença com relação à massa corporal ou massa dos órgãos entre os animais WT e NLRP3^{-/-}. O CC de animais NLRP3^{-/-} apresenta prejuízo para o relaxamento mediado por nitroprussiato de sódio (NPS) quando comparado com as tiras de CC de camundongos WT. A incubação com ET-1 10⁻⁷ M por 4 horas promove aumento na contração para fenilefrina (PE) e prejuízo no relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio (NPS), e o mesmo efeito não é observado nas tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-}. **Conclusão:** O NLRP3 contribui para o aumento na contração e prejuízo no relaxamento produzido pela ET-1 em CC de camundongos, possivelmente através da ativação da caspase-1. **Palavras-chave:** endotelina-1; disfunção erétil, NLRP3, caspase-1.

Abstract

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

Introduction: Erectile dysfunction (ED) is defined as the inability to achieve or maintain penile erection to perform sexual intercourse, it contributes significantly to the low quality of life and male psychosocial morbidity. Endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor peptide that promotes slow and sustained contraction of vascular smooth muscle cells, has great importance in the pathophysiology of ED. Several studies show that increased expression of inflammatory mediators is closely linked to the development of ED. The inflammasome is a multiproteic complex of the innate immune system that acts through activation of caspase-1, which leads to maturation of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 beta (IL-1 β). The activation of NLRP3 receptor, part of the inflammasome, leads to caspase-1 cleavage and subsequent secretion of IL-1 β . ET-1 also plays an important role in chronic vascular inflammation by mediating the release of pro-inflammatory cytokines. However, it is still unknown whether pro-inflammatory actions of ET-1 on smooth muscle cells is mediated by the activation of the inflammasome. **Hypothesis:** ET-1 activates NLRP3 in smooth muscle cells of the corpora cavernosa (SMCCC), promoting changes in corpus cavernosum (CC) reactivity. **Objective:** To evaluate the role of endothelin-1 in the activation of the NLRP3 in SMCCC of mice. **Methods:** SMCCC of C57BL/6 (WT) and NLRP3^{-/-} mice were grown in DMEM culture medium supplemented with bovine fetal serum (FBS) 10%, pre-incubated with endothelin-1 at concentrations of 10⁻⁹, 10⁻⁸ and 10⁻⁷M, in the presence of LPS or vehicle. We evaluated the effect of the NLRP3 deletion on the reactivity of the CC (contractility and relaxation by electric field and/or pharmacological stimulation). After that, we evaluated the ET-1 effect on activation NLRP3, changes on the reactivity of the CC of WT, and if these alterations would persist NLRP3^{-/-} and caspase1/11^{-/-} mice. **Results:** The cells presented fluorescent labeling to α -actin, but not for Von Willebrand factor, characterizing absence of endothelial cells contamination. The incubation with 10⁻⁷ M ET-1 for 24 h in the presence of LPS or vehicle increased caspase-1 activity in SMCCC from WT, but not from NLRP3^{-/-} mice. No difference was observed in body mass or weight of the organs between WT and NLRP3^{-/-} animals. The CC from NLRP3^{-/-} animals displayed impaired relaxation mediated by sodium nitroprusside (SNP) when compared to WT CC. The incubation with ET-1 10⁻⁷ M for 4 hours promoted an increase in the contraction to phenylephrine (PE) and reduced relaxation induced by sodium nitroprusside (SNP). The same effect was not observed in CC strips from NLRP3^{-/-} and caspase1/11^{-/-} mice. **Conclusion:** NLRP3 contributes to the increase in contraction and impaired relaxation produced by ET-1 in mice CC, possibly by activation of caspase-1. **Keywords:** endothelin-; erectile dysfunction, NLRP3, caspase-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Estrutura anatômica do pênis. As estruturas principais são representadas pela base, corpo e glândula.....	21
2	Irrigação arterial (A) e retorno venoso (B) do pênis.....	22
3	Inervação do pênis.....	23
4	Estrutura anatômica do corpo cavernoso. Anatomia da secção transversal do pênis humano no estado flácido e ereto. O diagrama aproximado mostra como as células endoteliais alinham-se nos espaços cavernosos, que por sua vez são cercados por uma rede de músculo liso.....	24
5	Estrutura dos 3 isopeptídeos da ET (A) e efeito da ET-1 na pressão arterial (B).....	29
6	Sinalização e formação do complexo inflamassoma.....	39
7	Caracterização de CMLCC de camundongos WT. Imunofluorescência para Von Willebrand (A), fator característico de células endoteliais, α -actina (B), característica de células de músculo liso, e DAPI (C) para marcação de núcleo. Sobreposição das imagens em (D).....	49
8	Caracterização de CMLCC de camundongos NLRP3 ^{-/-} . Fluorescência para Von Willebrand (A), característico de células endoteliais, α -actina (B), característica de células de músculo liso, e DAPI (C) para marcação de núcleo. Sobreposição das imagens em (D).....	50
9	Análise densitométrica dos receptores ET _A (A) e ET _B (B) em células de músculo liso do corpo cavernoso de camundongos WT (barra branca) e NLRP3 ^{-/-} (barra preta).....	51

10	Análise densitométrica da expressão de caspase-1 e pró-caspase-1. Índice de ativação da caspase-1, em macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina. CMLCC de camundongos WT (barras brancas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 2 horas com estímulo prévio com LPS ou veículo. A expressão da β -actina também é determinada e usada como controle interno.....	52
11	Análise densitométrica da expressão de caspase-1 e pró-caspase-1. Índice de ativação da caspase-1, em macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina. CMLCC de camundongos WT (barras brancas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 4 horas com estímulo prévio com LPS ou veículo. A expressão da β -actina também é determinada e usada como controle interno.....	53
12	Análise densitométrica da expressão de caspase-1 e pró-caspase-1. Índice de ativação da caspase-1, em macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina. CMLCC de camundongos WT (barras brancas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 24 horas com estímulo prévio com LPS ou veículo. A expressão da β -actina também é determinada e usada como controle interno.....	55
13	Análise densitométrica da ativação da caspase-1. Macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina; CMLCC de camundongos WT (barras brancas) e NLRP3 ^{-/-} (barras cinzas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 24 horas. A expressão da β -actina também é determinada e usada como controle interno.....	56
14	Análise densitométrica da expressão do inflamassoma NLRP3. Macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina; CMLCC de camundongos WT (barras brancas) sem estímulo, LPS/nigericina ou com ET-1 por 24 horas. A expressão da β -actina também é determinada e usada como controle interno.....	57
15	Análise densitométrica da atividade da IL-1 β . Macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por	

	LPS/nigericina; CMLCC de camundongos WT (barras brancas) e NLRP3 ^{-/-} (barras cinzas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 24 horas. A expressão da β -actina também é determinada e usada como controle interno.....	58
16	Massa corporal dos camundongos WT, NLRP3 ^{-/-} e caspase1/11 ^{-/-}	59
17	Massa seca dos CCs dos camundongos WT (barras brancas) e NLRP3 ^{-/-} (barras pretas) e caspase1/11 ^{-/-} (barras cinzas).....	60
18	Massa do coração (A), dos rins (B), do baço (C) e da próstata (D) de camundongos WT (barras brancas), NLRP3 ^{-/-} (barras pretas) e caspase1/11 ^{-/-} (barras cinzas).....	61
19	Contração induzida por KCl (120 mM) em tiras de CC de camundongos WT e NLRP3 ^{-/-}	62
20	Curvas frequência-resposta a ECE em tiras de CC de camundongos WT e NLRP3 ^{-/-} em presença de veículo (A), ou L-NAME e atropina (B). Comparação entre as curvas de contração para ECE em tiras de CC antes e após a incubação com L-NAME e atropina em camundongos WT (C) e NLRP3 ^{-/-} (D).....	63
21	Curvas concentração-efeito para PE em presença de veículo (A) ou L-NAME e atropina (B) em tiras de CC de camundongos WT e NLRP3 ^{-/-} . Comparação entre as curvas de contração para PE em tiras de CC antes e após a incubação com L-NAME e atropina em camundongos WT (C) e NLRP3 ^{-/-} (D).....	64
22	Curvas frequência-resposta para o relaxamento NANC (A), curvas concentração-efeito para ACh (B), NPS (C) e sildenafil (D), em tiras de CC de camundongos WT e NLRP3 ^{-/-} . Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e são calculados como a percentagem de relaxamento produzido em relação a pré-contração produzida pela fenilefrina (3X10 ⁻⁵ M).....	66
23	Contração induzida por KCl (120 mM) em tiras de CC de camundongos WT incubadas previamente com ET-1 10 ⁻⁷ M ou veículo por 4 horas.....	67

24	Curvas concentração-efeito para PE em tiras de CC de camundongos WT incubadas previamente com ET-1 10^{-7} M ou veículo por 4 horas.....	68
25	Curvas frequência-resposta para o relaxamento NANC (A), curvas concentração-efeito para ACh (B), NPS (C) e sildenafil (D), em tiras de CC de camundongos WT veículo e WT ET-1 10^{-7} M. Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e são calculados como a percentagem de relaxamento produzido em relação a pré-contracção produzida pela fenilefrina (3×10^{-5} M).....	69
26	Contração (A) e a duração da contração (B) induzida por ET-1 10^{-7} M em tiras de CC de camundongos WT, NLRP3 ^{-/-} e caspase1/11 ^{-/-}	70
27	Contração induzida por KCl (120 mM) em tiras de CC de camundongos WT, NLRP3 ^{-/-} e caspase1/11 ^{-/-} incubadas com ET-1 10^{-7} M ou veículo por 4 horas.....	71
28	Curvas concentração-efeito para PE em tiras de CC de camundongos NLRP3 ^{-/-} (A) e caspase1/11 ^{-/-} (B) incubadas previamente com ET-1 10^{-7} M ou veículo por 4 horas. Curvas concentração-efeito para PE em tiras de CC de camundongos WT, NLRP3 ^{-/-} e caspase1/11 ^{-/-} incubadas 4 horas com veículo (C).....	72
29	Curvas concentração-efeito para o relaxamento induzido por NPS em tiras de CC de camundongos NLRP3 ^{-/-} (A) e caspase1/11 ^{-/-} (B) incubadas previamente com ET-1 10^{-7} M ou veículo por 4 horas. Curvas concentração-efeito para NPS em tiras de CC de camundongos WT, NLRP3 ^{-/-} e caspase1/11 ^{-/-} incubadas 4 horas com veículo (C).....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA	TÍTULO	PÁGINA
1	Anticorpos utilizados.....	46
2	Valores de Emáx (mN/g tecido seco) e pD ₂ para contração induzida por PE e KCl em tiras de CC dos camundongos WT e NLRP3 ^{-/-}	65
3	Valores de Emáx (%) e pD ₂ das curvas concentração-efeito para o relaxamento induzido por ACh, NPS e sildenafil em tiras de CC dos camundongos WT e NLRP3 ^{-/-}	67
4	Valores de Emáx (mN/g tecido seco) e pD ₂ para contração induzida por PE e KCl em tiras de CC dos camundongos WT veículo e WT ET-1 10 ⁻⁷	68
5	Valores de Emáx (%) e pD ₂ das curvas concentração-efeito para NPS em tiras de CC dos camundongos WT veículo e WT ET-1 10 ⁻⁷ M.....	70
6	Valores de Emáx (mN/g tecido seco) para contração induzida por ET-1 em tiras de CC dos camundongos NLRP3 ^{-/-} e caspase1/11 ^{-/-}	71
7	Valores de Emáx (mN/g tecido seco) e pD ₂ para a contração induzida por KCl e PE em tiras de CC dos camundongos NLRP3 ^{-/-} e caspase1/11 ^{-/-}	73
8	Valores de Emáx (%) e pD ₂ para o relaxamento produzido por NPS em tiras de CC dos camundongos NLRP3 ^{-/-} e caspase1/11 ^{-/-}	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACh – Acetilcolina.
- AIM2 – Ausência de melanoma 2.
- ANOVA – Análise de variância.
- AP-1 – Proteína ativadora -1 (*activator protein-1*).
- ASC – Proteína do tipo espécie apoptótica contendo um domínio CARD (*apoptosis speck like protein containing a CARD domain*).
- BSA – Albumina sérica bovina.
- Ca²⁺ – Cálcio.
- CaMK – cinase de cálcio calmodulina (*calcium calmodulin kinase*).
- cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina (*cyclic adenosine monophosphate*).
- CARD – Domínio recrutador de caspase (*caspase recruitment domain*).
- CC – Corpo cavernoso.
- cGMP – Monofosfato cíclico de guanosina (*cyclic guanosine monophosphate*).
- CMLV – Célula de músculo liso vascular.
- CO₂ – Dióxido de carbono.
- COX – Ciclooxygenase.
- DAG – Diacilglicerol.
- DAMPS – Padrões moleculares associados a perigo (*danger associated molecular patterns*).
- DCV – Doenças cardiovasculares.
- DE – Disfunção erétil.
- DM – Diabetes mellitus.
- DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco.
- ECE – Estímulo por campo elétrico.
- EDCF - Fator contrátil derivado do endotélio (*endothelium derivated contracting factor*).
- EDRF – Fator relaxante derivado do endotélio (*endothelium-derivated relaxing factor*).

- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético.
- eNOS – Sintase de óxido nítrico endotelial.
- ET – Endotelina.
- ET-1 – Endotelina-1.
- ET_A – Receptor para endotelina do subtipo A.
- ET_B – Receptor para endotelina do subtipo B.
- EV – Endotélio vascular.
- GTP – Trifosfato de guanosina (*guanosine 5'-triphosphate*).
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio.
- HA – Hipertensão arterial.
- HDL – Lipoproteínas de alta densidade (*high-density lipoprotein*).
- ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1 (*intercellular adhesion molecule-1*).
- IL – Interleucina.
- IP₃ – Trifosfato de inositol (*inositol triphosphate*).
- K⁺ – Potássio.
- K_{Ca} – Canais para potássio ativados por cálcio.
- LRR – Domínios ricos em repetição de leucina (*leucine rich repeat*).
- MLC – Cadeia leve de miosina (*myosin light-chain*).
- MLCC – Músculo liso do corpo cavernoso.
- MLCK – Cinase de cadeia leve de miosina (*myosin light-chain kinase*).
- MLCP – Fosfatatase de cadeia leve de miosina (*myosin light-chain phosphatase*).
- NA – Noradrenalina.
- Na₃VO₄ – ortovanadato de sódio.
- NaCl – Cloreto de sódio.
- NAD(P)H – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*).

- NaF – Fluoreto de sódio.
- NANC – Não-adrenérgico não-colinérgico.
- NF-κB – Fator nuclear-Kappa B (*nuclear factor-κB*).
- NLR – Receptores do tipo domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (*nucleotide binding and oligomerization domain like receptors*).
- NLRP - Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos contendo Domínios ricos em repetição de leucina e domínio pirina (*Nucleotide binding and oligomerization domain containing leucine rich repeat and pyrin domain*).
- nNOS – Sintase de óxido nítrico neuronal.
- NO – Óxido nítrico.
- NOD – Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (*Nucleotide binding and oligomerization domain*).
- NPM – Neutrófilos polimorfonucleares.
- NPS – Nitroprussiato de sódio.
- O₂⁻ - Ânion superóxido.
- PACAP – Polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*).
- PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns*).
- PBS – Solução de tampão fosfato (*Phosphate buffered solution*).
- PC-PLD – Fosfolipase específica para fosfatidil colina (*phosphatidyl choline-specific phospholipase D*).
- PDE – Fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (*Cyclic nucleotide phosphodiesterases*).
- PE – Fenilefrina.
- PIP₂ – Fosfoinositol 4,5 bifosfato (*phosphoinositol 4,5 bisphosphate*).
- PI-PLC – Fosfolipase específica para fosfatidil inositol (*phosphatidyl inositol specific phospholipase C*).
- PKA – Proteína cinase A (*protein kinase A*).

- PKC – Proteína cinase C (*protein kinase C*).
- PKG – Proteína cinase G dependente de monofosfato cíclico de guanosina (*cGMP-dependent protein kinase G*).
- PLC – Fosfolipase C (*phospholipase C*).
- PRR – Receptor de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors*).
- PTK – Proteínas tirosina cinases (*protein tyrosine kinase*).
- PYD – Pirina (pyrin).
- RhoK – Rho cinase (*Rho kinase*).
- ROS – Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*).
- SDS - Dodecil sulfato de sódio.
- SOD – Superóxido dismutase.
- TGF- β – Fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor-beta*).
- TK – Tirosina cinase (*tyrosine kinase*).
- TLR – Receptor do tipo Toll (*Toll-like receptor*).
- TNF – Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*).
- VCAM-1 – Molécula de adesão da célula vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*).
- VIP – Peptídeo intestinal vasoativo (*vasoactive intestinal peptide*).
- WT – Camundongos C57BL/6.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1. A ereção.....	21
1.1.1. Anatomia Peniana.....	21
1.1.2. Fisiologia da ereção.....	23
1.1.3. Bases moleculares envolvidas no controle periférico da ereção.....	24
1.1.4. Disfunção erétil.....	25
1.2. Endotelina-1.....	28
1.2.1. História.....	28
1.2.2. Síntese da ET-1.....	29
1.2.3. Receptores para ET-1.....	31
1.2.4. Mecanismo de ação da ET-1.....	31
1.2.5. Papel da ET-1 na disfunção erétil.....	32
1.2.6. Papel da ET-1 na modulação da inflamação crônica.....	34
1.3. NLRP3.....	36
1.3.1. Sistema imune.....	36
1.3.2. Receptores de reconhecimento de padrão.....	36
1.3.3. O inflamassoma.....	37
1.3.4. Mediadores envolvidos na ativação do NLRP3.....	38
1.3.5. Importância do NLRP3 no sistema cardiovascular.....	40
2. Hipótese.....	41
3. Objetivo.....	41
3.1. Objetivos específicos.....	41
4. Material e métodos.....	42
4.1. Animais.....	42
4.2. Cultura de células do músculo liso do corpo cavernoso.....	42
4.2.1. Imunofluorescência para α -actina e fator de Von Willebrand.....	43

4.2.2. Estimulação das células.....	43
4.3. Cultura de macrófagos da medula óssea.....	44
4.4. Extração de Proteínas.....	44
4.6. Dosagem de Proteínas.....	45
4.7. Western Blot.....	45
4.8. Caracterização dos animais.....	46
4.9. Estudo de Reatividade no Corpo Cavernoso.....	46
4.10. Análise estatística.....	48
5. Resultados (Parte 1).....	49
5.1. Caracterização da cultura de CMLCC.....	49
5.2. Expressão dos receptores ET _A e ET _B em CMLCC de animais WT e NLRP3 ^{-/-}	51
5.3. Efeitos da ET-1 sobre a ativação da caspase-1.....	51
5.4. Efeitos da ET-1 sobre a ativação do NLRP3.....	55
6. Resultados (parte 2).....	59
6.1. Caracterização dos animais.....	59
6.1.1. Massa corpórea.....	59
6.1.2. Massa seca do CC.....	59
6.1.3. Massa dos órgãos.....	60
6.2. Caracterização da reatividade do CC.....	67
6.3. Reatividade do corpo cavernoso após incubação com ET-1.....	62
7. Discussão.....	76
8. Conclusão.....	85
9. Referências.....	86
Anexo.....	100

1. Introdução

1.1. A ereção

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

1.1.1. Anatomia peniana

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

Figura 1. Estrutura anatômica do pênis. As estruturas principais são representadas pela base, corpo e glândula. (EARDLEY *et al.*, 2003)

O influxo sanguíneo ao corpo cavernoso (CC) é provido, principalmente, pelas artérias cavernosas, via artéria pudenda interna (**figura 2A**). Os ramos das artérias cavernosas formam as artérias helicoidais, as quais se abrem diretamente para os espaços cavernosos, que contém

uma rede de comunicação com o plexo venoso subtúnico. Estas, por sua vez, formam as veias de maior calibre que, por fim, são drenadas pelas veias dorsal profunda, cavernosas e crurais (RITCHIE e SULLIVAN, 2001) (**figura 2B**).

Figura 2. Irrigação arterial (A) e retorno venoso (B) do pênis. (EARDLEY *et al.*, 2003)

Os vasos sanguíneos e o músculo liso do CC (MLCC) recebem inervações que originam-se de neurônios da medula espinhal e dos gânglios periféricos, as inervações simpáticas e parassimpáticas se fundem para formar o nervo cavernoso, o qual penetra nos corpos cavernosos e esponjosos para promover os eventos neurovasculares durante a ereção e detumescência. Os nervos somáticos são primariamente responsáveis pelas sensações e pela contração dos músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso (DEAN e LUE, 2005) (**figura 3**).

A via simpática, mediada principalmente por nervos adrenérgicos (RITCHIE e SULLIVAN, 2001), origina-se a partir do 11º segmento torácico e do 2º lombar, passa através do ramo ventral do nervo espinhal (ramo branco) para a cadeia ganglionar simpática. Algumas fibras trafegam através dos nervos esplênicos para os plexos hipogástrico superior e mesentérico inferior, através do nervo hipogástrico, em direção ao plexo pélvico. Em humanos, os segmentos torácico de 10 ao 12, frequentemente, dão origem às fibras simpáticas e a cadeia de células ganglionares que se projetam para o pênis estão localizadas nos gânglios sacral e caudal (DEAN e LUE, 2005) (**figura 3**).

A via parassimpática, mediada principalmente por nervos colinérgicos e não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC) (RITCHIE e SULLIVAN, 2001), origina-se de neurônios da coluna de células intermediolateral do 2º, 3º e 4º segmentos sacrais. As fibras pré-ganglionares passam pelos nervos pélvicos para o plexo pélvico, juntam-se as fibras simpáticas vindas do plexo hipogástrico para formar os nervos cavernosos. A estimulação do

plexo pélvico e do nervo cavernoso induz ereção, enquanto que a estimulação do tronco simpático causa detumescência (DEAN e LUE, 2005) (**figura 3**).

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

1.1.2. Fisiologia da ereção

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

A dilatação das arteríolas e dos sinusóides do CC resulta em aumento do fluxo sanguíneo, impulsionado pela força da pressão arterial, e subsequente elevação da pressão intracavernosa. A resposta erétil segue como consequência da pressão intracavernosa elevada

que provoca expansão da túnica albugínea externa, o que resulta em aumento do comprimento e diâmetro do pênis, característicos da ereção (**figura 4**).

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

Figura 4. Estrutura anatômica do corpo cavernoso. Anatomia da seção transversal do pênis humano no estado flácido e ereto. O diagrama aproximado mostra como as células endoteliais alinham-se nos espaços cavernosos, que por sua vez são cercados por uma rede de músculo liso. (RITCHIE e SULLIVAN, 2001)

1.1.3. Bases moleculares envolvidas no controle periférico da ereção

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

contráteis ao Ca^{2+} , o que leva ao relaxamento do músculo liso. A PKG reduz os níveis intracelulares de Ca^{2+} através da fosforilação de canais iônicos, que reduz o influxo ou inibe a liberação intracelular de Ca^{2+} (SCHLOSSMANN *et al.*, 2003).

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

A adenilato ciclase é ativada por diversos receptores acoplados a proteína G, como β -adrenoceptores, receptores prostanóides do tipo EP₂ e EP₄, peptídeo intestinal vasoativo (*vasoactive intestinal peptide* – VIP), polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* – PACAP), e tem a função de aumentar os níveis intracelulares de cAMP. Este, por sua vez, medeia o relaxamento do músculo liso do CC primariamente através da ativação da proteína cinase A (*protein kinase A* – PKA) e da redução intracelular de Ca^{2+} e/ou a sensibilidade ao Ca^{2+} (PRIETO *et al.*, 1997; PRIETO *et al.*, 2000).

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

A fase de detumescência depende, principalmente, da elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , considerado como clássico acionador da contração do músculo liso, promove a ativação da cinase de cadeia leve de miosina (*myosin light-chain kinase* – MLCK) que leva a fosforilação da cadeia leve de miosina (*myosin light-chain* – MLC). Entretanto, este mecanismo não é o único responsável pela contração do músculo liso. Pois, a inibição da fosfatase da MLC (*MLC phosphatase* – MLCP), por mecanismos independentes de Ca^{2+} , resulta na manutenção da fosforilação da MLC (SOMLYO e SOMLYO, 2000). A ligação de agonistas contráteis a receptores acoplados a proteína G, frequentemente, estimula ambos os mecanismos, a entrada e a mobilização das reservas intracelulares de Ca^{2+} (BERRIDGE, 2003; MCFADZEAN e GIBSON, 2002).

Apesar da grande dependência da entrada de Ca^{2+} para a contração do CC, existem também outros mecanismos potentes de sensibilização ao Ca^{2+} , de proteínas contráteis que envolvem diversas cinases, como proteína cinase C (*protein kinase C* – PKC), tirosina cinase (*tyrosine kinase* – TKs) e Rho cinase (*Rho kinase* – RhoK) (47). RhoA é um membro da superfamília Ras, de pequenas proteínas ligadas ao trifosfato de guanosina (*guanosine 5'-triphosphate* – GTP), e RhoK é uma cinase que é ativada por RhoA através da fosforilação de seus resíduos de serina/treonina (SOMLYO e SOMLYO, 2000). A atividade da RhoA/RhoK possui uma grande importância na regulação da contratilidade do CC e manutenção do estado flácido do pênis (CHITALEY *et al.*, 2002).

1.1.4. Disfunção Erétil

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de alcançar ou manter a ereção peniana por tempo suficiente para um desempenho sexual satisfatório (*NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS STATEMENT*, 1993). É considerada uma desordem comum, que afeta 52% dos homens com idades entre 40 e 70 anos (FELDMAN *et al.*, 1994). Além disso, a DE é um fator agravante para redução da qualidade de vida e morbidade psicossocial para homens sexualmente ativos, afeta mais de 30 milhões de indivíduos nos EUA (LUE, 2000), tornando-se assim um problema de saúde pública. A prevalência da DE é muito alta, com previsão de aumentar consideravelmente nos próximos 10 anos, podendo afetar mais de 300 milhões de homens em todo mundo até 2025 (AYTA *et al.*, 1999).

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

A gênese da DE pode ser classificada como de origem psicossocial, neurológica, hormonal, por doenças vasculares ou pela combinação destes fatores (LUE, 2000). Doenças vasculares do pênis são as causas mais comuns de DE e podem envolver diversos mecanismos

fisiopatológicos, como: a disfunção endotelial, o prejuízo no influxo arterial, a diminuição no relaxamento ou aumento da contração do MLCC, isquemia crônica induzida pelo aumento da contração do MLCC, fibrose, disfunção veno-oclusiva ou hipoxemia crônica (KIRBY *et al.*, 2001; GRATZKE *et al.*, 2009).

De fato, a DE está associada a muitas outras DCV. Intimamente associada à diabetes do tipo 1 e do tipo 2, com prevalência de 35 a 75% em homens diagnosticados com diabetes, em relação a 5 a 15% em homens saudáveis (RENDELL *et al.*, 1999; NEHRA *et al.*, 2013). Além disso, estudos epidemiológicos mostraram a DE como um marcador para o surgimento de DCV, uma vez que pacientes com DCV frequentemente tem DE e que os sintomas da DE quase sempre precedem os apresentados na DCV (KUMAR *et al.*, 2013; NEHRA *et al.*, 2013). Apesar dos inúmeros estudos mostrarem a associação entre a DE e DM, HA, dislipidemia, síndrome metabólica, depressão e sintomas do baixo trato urinário, há muito poucos estudos sobre o papel do sistema imune na DE.

Em 2006, BLANS e colaboradores demonstraram que o aumento da proteína C reativa está frequentemente associado a DE em pacientes com diabetes, comprovando assim que o processo inflamatório possui um papel importante na DE. Em 2009, CARNEIRO e colaboradores mostraram o papel do fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor alpha – TNF- α) na DE. Posteriormente, constatou-se que existe uma correlação entre a DE e níveis subclínicos de inflamação (ARAÑA ROSAÍNZ *et al.*, 2011). Em estudo recente comprovou-se que o aumento do processo inflamatório crônico, envolvendo receptores do tipo toll, que pertencem ao sistema imune inato, está fortemente envolvido com o surgimento da DE (STALLMANN-JORGENSEN *et al.*, 2015;).

1.2. Endotelina-1

1.2.1. História

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

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

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

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

1.2.2. Síntese da ET-1

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

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

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

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

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

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

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

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

A produção de ET-1 é regulada também por diversos outros fatores, que podem incluir citocinas, como fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor-beta* – TGF- β), TNF- α , interleucinas (IL), insulina, NA, angiotensina II e trombina

(YANAGISAWA *et al.*, 1988; EMORI *et al.*, 1992). O NO, a prostaciclina e o peptídeo natriurético são responsáveis por reduzir a produção de ET-1 em células endoteliais (PRINS *et al.*, 1994; REDMOND *et al.*, 1996).

1.2.3. Receptores para ET-1

Existem dois receptores para ET-1, denominados ET_A e ET_B. Estes receptores possuem 7 domínios transmembrana e são acoplados a proteína G (Davenport, 2002). Estes receptores medeiam os efeitos que a ET-1 exerce em funções como a diurese (KOHAN, 2006).

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

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

1.2.4. Mecanismo de ação da ET-1

A sinalização da ET-1 pode ocorrer através da ativação de receptores ET_A e ET_B. Classicamente, após ativar o receptor ET_A, este estimula a fosfolipase C (*phospholipase C* – PLC), leva a formação de trifosfato de inositol (*inositol triphosphate* – IP₃) e diacilglicerol (DAG) a partir de fosfoinositol 4,5 bifosfato (*phosphoinositol 4,5 bisphosphate* – PIP₂). O IP₃ então se difunde para os seus respectivos receptores no retículo sarcoplasmático e promove a liberação das reservas de Ca²⁺ para o citosol, promovendo um rápido aumento na concentração intracelular de Ca²⁺, que por sua vez, leva a contração do músculo liso vascular (SIMONSON e DUNN, 1990). O efeito vasoconstritor da ET-1 permanece mesmo após a dissociação da ET-1 do receptor, podendo ser devido aos níveis de Ca²⁺ permanecerem elevados no citosol (CHESTER *et al.*, 1989), ou devido a via de sinalização da ET-1 permanecer ativa por longos períodos (CLARKE *et al.*, 1989).

Na via de sinalização não clássica, a ET-1 estimula uma fosfolipase específica para fosfatidil colina (*phosphatidyl choline-specific phospholipase D* – PC-PLD) e fosfolipase específica para fosfatidil inositol (*phosphatidyl inositol specific phospholipase C* – PI-PLC), ambas ligadas ao receptor ET_A (CLERK *et al.*, 1997). Adicionalmente, a ET-1 estimula a produção de ácido araquidônico e liberação de prostaglandinas (SUZUKI *et al.*, 1992), através da ativação da fosfolipase A₂ e aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ (53). A ET-1 também estimula proteínas tirosina cinases (*protein tyrosine kinase* – PTK) como FAK e RAS (NELSON *et al.*, 2003), ativam assim a via RAF/MEK/MAPK, e subsequentemente estimulam a transcrição de protooncogenes, como c-FOS, c-MYC e c-JUN, promovendo assim crescimento celular e metástase.

A ET-1 promove a contração do músculo liso vascular também através de vias que não dependem do aumento das concentrações intracelulares de Ca²⁺, através da estimulação de RhoK (MAEKAWA *et al.*, 1999), Raf-1 (BORMAN *et al.*, 2002) e cinase ligada a integrina (MURANYI *et al.*, 2002).

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

1.2.5. Papel da ET-1 na disfunção erétil

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

A ET-1 também modula o efeito contrátil de diferentes agonistas, como a NA (MUMTAZ *et al.*, 2006). Este mecanismo deve-se em grande parte pela ação do receptor ET_A, através do aumento da atividade da enzima RhoA (WINGARD *et al.*, 2003). O papel dos receptores ET_B no CC ainda não está bem estabelecido, podendo induzir redução no tônus do CC mediado por NO (ARI *et al.*, 1996; PARKKISENNIEMI e KLINGE, 1996). Este é um

mecanismo regulatório, e é ativado para reduzir o efeito contrátil da ET-1 em situações patológicas, como na hipóxia, protegendo assim as estruturas do CC (FILIPPI *et al.*, 2003).

Diversos estudos mostram que o aumento de ET-1 possui um papel fisiopatológico em várias doenças e está frequentemente associado à DE (RITCHIE e SULLIVAN, 2011), como na DM (FRANCAVILLA *et al.*, 1997), consumo de drogas de adicção, como a cocaína (KENDIRCI *et al.*, 2007) ou na HA. A ET-1 está envolvida diretamente no prejuízo da disfunção renal e no remodelamento cardíaco (KARAM *et al.*, 1996).

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

Ambos os receptores para ET-1, ET_A e ET_B são expressos no MLCC (CARNEIRO *et al.*, 2008a). A ET-1 induz vasoconstrição no CC através de receptores ET_A e subsequente ativação de vias dependentes de Ca²⁺, IP₃, e independentes de Ca²⁺, Rho/RhoK, (WINGARD *et al.*, 2003). Por outro lado, a ativação de receptores ET_B induz vasodilatação, aumentando a produção de NO em células endoteliais (ARI *et al.*, 1996).

A ET-1 mostra-se essencial na patogênese de algumas formas de HA, como já foi mostrado que camundongos com hipertensão mineralocorticoide apresentam resposta aumentada na reatividade no CC, além de aumento na expressão da ET-1 (CARNEIRO *et al.*, 2008a). Esse aumento na pressão arterial e redução na função erétil deve-se a ET-1 estimular receptores ET_A (CARNEIRO *et al.*, 2008b).

A ET-1 induz aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), principalmente por meio da ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* – NAD(P)H) oxidase via ET_A e, assim, reduz a biodisponibilidade de NO (SANCHEZ *et al.*, 2014). Ademais, ROS é produzido durante a hipertensão e também é capaz estimular a produção de ET-1 (HUGHES *et al.*, 1996), criando assim um ciclo que leva ao aumento na constrição do CC. Os receptores ET_B exercem função importante na patogênese na DE, pois contribui para aumento na geração de ROS e disfunção endotelial em artérias penianas de ratos que apresentam resistência à insulina e obesidade (SANCHEZ *et al.*, 2014).

Destaca-se que a ET-1 estimula não somente a vasoconstrição no CC, como também na artéria pudenda interna, que é a principal artéria fornecedora de sangue para o CC (ALLAHDADI *et al.*, 2010). Também foi demonstrado que o CC, de ratos hipertensos

DOCA/sal, possui resposta contrátil aumentada para ET-1 e para outros agonistas contráteis quando comparada com ratos normotensos (CARNEIRO *et al.*, 2008a, CARNEIRO *et al.*, 2008b).

O consumo abusivo de etanol aumenta a concentração plasmática e a potência da contração induzida pela ET-1, e também uma maior expressão de receptores ET_A no MLCC (LEITE *et al.*, 2013). Este efeito pode ser devido ao aumento na produção de ânion superóxido (O₂⁻), ROS e da catalase, além da redução da superóxido dismutase (SOD) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que estão envolvidos na patogênese da disfunção erétil, seguida do consumo crônico de etanol (MUNIZ *et al.*, 2015).

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

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

A ET-1 incrementa a síntese de TNF que estimula a quimiotaxia e fagocitose em macrófagos e neutrófilos (BELLISAI *et al.*, 2011). Diversos estudos mostram que ET-1 aumenta os níveis de TNF através de ET_A (OZDEMIR *et al.*, 2006; FORD *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2010). O papel dos receptores ET_B ainda é controverso, pois o uso de BQ788, antagonista ET_B, reduz a expressão de TNF quando aplicado em pacientes com lesão no nervo óptico (TONARI *et al.*, 2012). Entretanto, PIECHOTA-POLANCZYK e colaboradores (2012), não encontraram alterações nas concentrações de TNF, após a aplicação de BQ788, no coração de ratos.

A ET-1 aumenta a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (LI *et al.*, 2003b; CALLERA *et al.*, 2004), estimula a agregação de neutrófilos polimorfonucleares (NPM) e contribui para o aumento no processo inflamatório e disfunção endotelial. A ET-1 estimula molécula de adesão celular vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule-1* – VCAM-

1) arterial em pacientes com hipertensão arterial (LI *et al.*, 2003b). A VCAM-1 e a molécula de adesão intercelular-1 (*intercellular adhesion molecule-1* – ICAM-1) são responsáveis pela adesão de células vasculares no leito vascular (BLANKENBERG *et al.*, 2003).

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

O aumento na expressão de ET-1 está frequentemente ligado a modelos experimentais de aterosclerose, bem como na aterosclerose em humanos (BARTON *et al.*, 2003), e seu nível está associado com a severidade da lesão aterosclerótica (HAUG *et al.*, 1996) e elevação no infiltrado de macrófagos (DASHWOOD e TSUI, 2011). A Hiper-expressão de ET-1 possui um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose e aneurisma de aorta abdominal, por meio da redução dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (*high-density lipoprotein* – HDL), aumenta ROS e também o infiltrado de monócitos e macrófagos (LI *et al.*, 2013a).

Diversos estudos apontam a ET-1 como responsável pelo aumento de marcadores inflamatórios presente na HA (PARISSIS *et al.*, 2002). Em contrapartida, observou-se significativo remodelamento, disfunção endotelial e aumento da geração de ROS sem elevação da pressão arterial em camundongos transgênicos que hiper-expressam pré-pro-ET-1 humana (AMIRI *et al.*, 2004).

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

Muito é conhecido sobre o papel da ET-1 na modulação do processo inflamatório crônico. Entretanto, o seu papel na liberação de mediadores inflamatórios no músculo liso vascular, bem como a via de sinalização envolvida ainda não estão muito bem esclarecidos. Um possível mecanismo, seria através do NLRP3, que tem a função de promover a ativação da caspase-1 e, com isso, a maturação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β .

1.3. NLRP3

1.3.1. Sistema imune

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

1.4.2. Receptores de reconhecimento de padrão

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

Os PRRs são responsáveis por reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns* – PAMPs) ou a perigo (*danger associated molecular patterns* – DAMPs). A ativação destes receptores induz respostas imunes que são essenciais para a defesa do hospedeiro e reparo tecidual. No entanto, quando a infecção ou dano tecidual é muito grande, a resposta inflamatória pode ser prejudicial para o hospedeiro. Os receptores NOD, contendo ricas repetições de leucina (*leucine-rich repeat* – LRR) são PRRs que iniciam

respostas inflamatórias a uma grande variedade de estímulos. NLRs são encontrados intracelularmente e compartilham uma estrutura de domínio único, que consiste em um domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos chamado domínio NATCH, localizado entre um domínio N-terminal efetor e um domínio LRR C-terminal (MARTINON *et al.*, 2009, PEDRA *et al.*, 2009).

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

1.4.3. O inflamassoma

Existem diferentes PRRs que agem em conjunto, com a função de manter o organismo livre de agressões por DAMPs e PAMPs. Estes PRRs podem ser ligados a membrana, como os TLRs e receptores para lectina tipo C, ou intracelulares, como os NLRs, que são especializados na detecção de DAMPs e PAMPs que atingem o citosol ou as organelas celulares.

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

A secreção de IL-1 β está envolvida em diversas respostas do sistema imune, como a febre, aumento da migração de leucócitos para sítios de infecção, além de promover aumento da resposta do sistema imune adaptativo (SIMS e SMITH, 2010). A IL-18 promove a polarização de células T *helper* (TH) 1 e 2, na presença de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-4 e IL-10 (NAKANISHI *et al.*, 2001; HARRINGTON *et al.*, 2005; DINARELLO, 2009).

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

A proteína do tipo espécie apoptótica contendo um domínio CARD (*apoptosis speck like protein containing a CARD domain* – ASC) possui dois domínios: CARD e PYD. O domínio CARD acopla-se a pró-caspase-1 e o domínio PYD a proteínas formadoras do inflamassoma, como NLRP3 e NLRP1, o que levando a autoclivagem da pró-caspase-1 e formação de suas formas ativas, o tetrâmero caspase-1. Entretanto, existem outras vias compensatórias envolvidas na ativação da caspase-1, como a caspase-11 (também conhecida como caspase-4).

Outros membros da família do inflamassoma também promovem a maturação da caspase-1, como o NLRP-1 e o NLRC4, através de seu domínio CARD nas suas porções carboxil e amino terminais, algumas vezes não necessitam o recrutamento da ASC por interagirem diretamente com a caspase-1 (HSU *et al.*, 2008).

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

1.4.4. Mediadores envolvidos na ativação do NLRP3

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

O segundo sinal induz a oligomerização do NOD e reunião da plataforma inflamassoma. Existem diversos ativadores do NLRP3, que incluem estímulos biológicos e

químicos ligados a PAMPs e DAMPs (HOFFMAN e BRYDGES, 2011), sendo 3 principais estímulos para sua ativação (**Figura 6**).

Figura 6. Sinalização e formação do complexo inflamassoma (adaptado MARIATHASAN e MONACK, 2004).

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

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

1.4.5. Importância do NLRP3 no sistema cardiovascular

O processo inflamatório crônico causado pela ativação do NLRP3 está envolvido em diversas DCV, como aterosclerose (YIN *et al.*, 2013), insuficiência cardíaca (KAWAGUCHI *et al.*, 2011) e doença renal crônica (VILAYSANE *et al.*, 2010; KOMADA *et al.*, 2014).

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

Considerando que os mecanismos periféricos responsáveis pela ereção são similares aos envolvidos no processo de regulação do tônus vascular, e que a DE compartilha dos mesmo fatores de risco que as doenças cardiovasculares (SHABSIGH *et al.*, 2005), é possível que a ativação do NLRP3 esteja envolvida na gênese da DE.

2. Hipótese:

Considerando que a ET-1: 1) Exerce um papel importante em modelos experimentais de DE; 2) Promove mudanças na reatividade do corpo cavernoso; 3) Possui atividade pró-inflamatória em diversos leitos vasculares; 4) Induz a liberação de citocinas como a IL-1 β e IL-18; Considerando ainda que o NLRP3: 1) Leva a maturação e secreção da IL-1 β e IL-18; 2) Está envolvido na inflamação vascular crônica em diversas doenças cardiovasculares, o presente estudo testará a hipótese de que o NLRP3 medeia a atividade pró-inflamatória da ET-1 em CMLCC e as alterações de reatividade do CC.

3. Objetivo

Investigar o papel da ET-1 na ativação do NLRP3 no tecido cavernoso de camundongos.

3.1. Objetivos específicos:

- 1) Verificar se a ET-1 ativa a caspase-1 em CMLCC.
- 2) Verificar se a ativação da caspase-1 em CMLCC pela ET-1 ocorre via NLRP3.
- 3) Avaliar os efeitos da presença/ativação de NLRP3 sobre a reatividade no CC.
- 4) Avaliar os efeitos da ET-1 sobre a reatividade no CC.
- 5) Avaliar o efeito da deleção do NLRP3 ou caspase1/11 no aumento da contração e prejuízo no relaxamento promovido pela incubação com ET-1.

4. Material e Métodos:

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos controle C57BL/6 (WT) provenientes do biotério de criação do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e camundongos NLRP3^{-/-} (MARIATHASAN *et al.*, 2006) e caspase1/11^{-/-} (KUIDA *et al.*, 1995), gerados a partir do de camundongos WT, provenientes do Biotério dos Departamentos de Bioquímica e Imunologia e Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos. Esses animais foram alocados no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, mantidos em temperatura controlada (20 a 22°C), ciclos claro/escuro de 12 horas, 60% de umidade e alimentação com ração padrão e água *ad libitum*. Os camundongos foram utilizados na idade de 10 a 12 semanas (25 gramas). Todos os protocolos experimentais em animais foram submetidos para avaliação na Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA n° 005/2015-1) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.2. Cultura de células do músculo liso do corpo cavernoso.

Os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO₂). Os corpos cavernosos foram isolados e lavados em solução salina com tampão fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS), contendo cloreto de sódio 0,125 mol/L, cloreto de potássio 0,005 mol/L, fosfato de sódio monobásico 0,008 mol/L e fosfato de sódio dibásico 0,002 mol/L. Após, o tecido foi incubado em meio de cultura F12 (3mg/mL) por 15 minutos, a 37°C. Em seguida, foi realizada, em ambiente estéril, a trituração mecânica do tecido, e o mesmo foi incubado em 12,5 mL de meio F12 contendo 25 mg de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Aldrich), 25 mg de colagenase (Worthington BR N° 4196), 1,5 mg de elastase (Sigma Aldrich) e 4,5 mg de inibidor de tripsina (Sigma Aldrich) por 30 minutos, a 37°C, para digestão e remoção da camada endotelial. Posteriormente, a solução foi passada por gradiente de agulhas de diferentes calibres (16G, 18G e 20G) para a ruptura do tecido por atrito e a obtenção de solução homogênea. A solução foi então filtrada (filtro de nylon de 100 µm) para a separação das CMLCC. O produto final foi centrifugado (em 5000 rpm, por 10 minutos, em temperatura ambiente). O sobrenadante foi então descartado e o pellet celular ressuspensão em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) 90% e soro fetal bovino 10%. As

células foram incubadas em estufa e aeradas com CO₂ (5%), umidade 80% e temperatura de 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas. Para cada protocolo de cultura de CMLCC foram utilizados 4 animais.

4.2.1. Imunofluorescência para α -actina e fator de Von Willebrand

As células foram lavadas 3 vezes com PBS e, logo após, 1 mL de paraformaldeído 4% foi adicionado (15 a 20 minutos). As células foram então lavadas 3 vezes com PBS. Em seguida, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA 1% diluída em PBS, por 30 minutos, em temperatura ambiente. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e, então, com Triton/PBS 0,5%. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos primários, anti- α -actina (ABCAM ab7817) e anti-fator de Von Willebrand (Santa Cruz sc8068), diluídos em PBS com 1% de BSA a 4°C por 12 horas. No dia seguinte, as células foram lavadas 2 vezes em PBS e com Triton/PBS 0,5%. As células foram incubadas por 1 hora com anticorpos secundários (anti-IgG da mesma espécie animal do anticorpo primário), anti-IgG camundongo (Vector FI-2000) e anti-IgG cabra (Vector TI-5000), diluídos em HEPES 0,01 mol/L, pH 7,5 (1:200). Em seguida, as células foram lavadas novamente 2 vezes com PBS para retirada do anticorpo secundário. Para melhor visualização das células, os núcleos foram marcados com DAPI (4'',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride – Anaspec 83211) 1 µg/mL, durante 5 minutos. As células foram novamente lavadas e, então, realizada leitura da fluorescência. A autofluorescência foi avaliada pela utilização de um poço apenas incubado com anticorpo secundário diluído em PBS com 1% BSA.

4.2.2. Estimulação das células

Após observada confluência de 80-100% nas placas, as CMLCC foram incubadas durante 24 horas com meio de cultura DMEM contendo soro fetal bovino (1%) para não haver interferência de estímulos proliferativos nos resultados. Posteriormente, foram estimuladas com ET-1 nas concentrações de 10⁻⁹, 10⁻⁸ e 10⁻⁷ M, com ou sem a adição de LPS (1µg/mL), nos tempos de 2, 4 ou 24 horas. Os macrófagos foram incubados em meio de cultura RPMI completo sem a adição de L929 e estimulados 4 horas por somente LPS (1µg/mL) ou com a adição de nigericina (20µM).

4.3. Cultura de macrófagos da medula óssea

Os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO₂). Os fêmures foram retirados e lavados em solução salina com tampão fosfato, contendo cloreto de sódio 0,125 mol/L, cloreto de potássio 0,005 mol/L, fosfato de sódio monobásico 0,008 mol/L e fosfato de sódio dibásico 0,002 mol/L. Após, em ambiente estéril, as epífises ósseas foram cortadas e com o auxílio de uma seringa a medula foi pressionada do interior do fêmur com meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) incompleto, composição para 1 litro de meio de cultura: Hepes 2,38 g, RPMI 1640 com fenol-red 10,40 g (Sigma R6504-1L), NaHCO₃ 2,20g e pH 7,2], e coletada em um tubo falcon de 15 mL, o volume final do falcon foi completado com meio de cultura RPMI.

O meio de cultura foi centrifugado a 400g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após, o sobrenadante foi descartado e posteriormente adicionou-se tampão de lise, contendo NH₄Cl 4,01g, EDTA 0,18g, NaHCO₃ 0,42g e pH 7,2, para lisar as células sanguíneas. O meio de cultura foi centrifugado novamente a 400g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após, o sobrenadante foi descartado e adicionado novamente meio de cultura RPMI incompleto. O meio de cultura foi centrifugado a 400g por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi homogeneizado com 8 mL do meio de cultura RPMI completo, contendo soro fetal bovino 10% do volume total, L929 (obtido do sobrenadante do meio da cultura de fibroblastos) 30% do volume total (para diferenciação de macrófagos) penicilina 80 µL, fungizona 9,6 µL, glutamina 104 µL, RMPI incompleto até completar 8 mL do volume e pH 7,2.

As células foram incubadas em estufa de O₂ (95%) CO₂ (5%), umidade 80%, a 37°C. Os macrófagos foram obtidos, no dia 1, a partir da medula óssea e incubados em placa de cultura com 10 mL do meio de cultura RPMI completo. No quarto dia foi adicionado 10 mL de RPMI completo na placa. No sétimo dia os macrófagos foram contados e diferenciados em M0, e então, estes foram estimulados por 4 horas com LPS e após por 1 hora com nigericina.

4.4. Extração de Proteínas

Após as estimulações, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas três vezes com PBS. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de tampão de lise celular (Tris 0,05 mol/L, cloreto de sódio (NaCl) 0,150 mol/L, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,001 mol/L, Triton X-100 1%, Deoxicolato 1%, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1%,

ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) 0,001 mol/L, fluoreto de sódio (NaF) $0,1 \times 10^{-6}$ mol/L –e inibidor de proteases (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets –S8820 1X) 2 μL para cada 1 mL. As células foram então retiradas das placas de Petri mecanicamente. Em seguida, as células foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL, submetidas a homogeneização por rotação durante 30 minutos. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado na velocidade de 13.600 rpm a 4°C durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e acondicionado em novos tubos plásticos de 1,5 mL na temperatura de -80°C.

4.6. Dosagem de Proteínas:

Para determinação da concentração protéica nas amostras, foi utilizado o protocolo de Bradford. A cada experimento foi construída uma curva-padrão com solução de albumina nas concentrações de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,50; 1,0 e 2,0 mg/mL. Para tanto, a cada 300 μL do reagente de Bradford, foram adicionados 10 μL de cada amostra ou ponto da curva. Quando necessário, a amostra foi diluída 1:5 ou 1:10. O branco foi determinado pela leitura de 10 μL de água em 300 μL do reagente de Bradford. A absorbância foi lida a 595 nm para a determinação proteica. Foram subtraídos os valores de absorbância do branco de cada amostra e o resultado foi aplicado à uma regressão linear das concentrações de BSA, de 2 mg/ml – 0.03125 mg/mL, reta da curva-padrão. O resultado foi expresso em mg de proteína/mL.

4.7. Western Blot

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

membranas foram deblotadas com Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo) por 45 minutos a 37° C para serem reutilizadas. A análise densitométrica foi realizada pelo programa ImageJ®.

Tabela 1. Anticorpos utilizados

Anticorpo	Empresa	Catálogo	Diluição
Anticorpo monoclonal de rato anti-NLRP3/NALP3	R&D	MAB7578	1:250
Anticorpo Monoclonal de camundongo Caspase-1	Imgenex	IMG-5028	1:500
Anticorpo policlonal de coelho anti-IL-1 β (H-153)	Santa Cruz	SC-7884	1:500
Anticorpo policlonal de coelho anti-ET _A	Alomone	ERA-001	1:200
Anticorpo policlonal de coelho anti-ET _B	Alomone	ERA-002	1:200

4.8. Caracterização dos animais

Foram aferidas as massas corporais dos camundongos WT, NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-}, a massa do coração, dos rins, próstata e baço e normalizadas pelo comprimento da tíbia. As tiras de CC foram colocadas na estufa por 24 horas embrulhadas em papel alumínio e após a sua massa foi aferida.

4.9. Estudo de Reatividade no Corpo Cavernoso:

Os camundongos WT e NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-} foram sacrificados em câmara de CO₂ e o pênis foi extirpado e transferido para uma solução refrigerada de Krebs Henseleit com a seguinte composição: NaCl 130 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM, MgSO₄.7H₂O 1,17 mM, NaHCO₃ 14,9 mM, EDTA 0,026 mM, CaCl₂.2H₂O 1,6 mM, e D-glicose 5,55 mM.

O CC foi dissecado e as artérias dorsais juntamente com o tecido esponjoso foram removidos. Duas preparações de tira do CC (1x1x5 mm) foram obtidas de cada pênis. Em seguida, as tiras do CC colocadas em câmaras de miógrafos de 5 mL (Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca) contendo solução de Krebs Henseleit aquecida a 37 °C, pH 7,4 e continuamente aeradas com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂).

Os tecidos foram submetidos à tensão basal de 2,5 mN. Esta tensão foi ajustada a cada 20 minutos, durante o período de estabilização de 60 minutos. Mudanças na tensão isométrica foram registradas através um sistema de aquisição de dados PowerLab/8S (Labchart software, versão 8.0; ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA). Para verificar a integridade das preparações do CC, depois de finalizado o período de estabilização, estas foram estimuladas com fenilefrina (PE 10⁻⁶M) durante 5 minutos. Após este período, cada preparação foi lavada com Krebs em intervalos de 10 minutos, durante o período de 30 minutos. Para avaliar as respostas de relaxamento, as tiras de CC foram pré-contraídas com fenilefrina (10⁻⁶ M) durante 10 minutos e, em seguida, curvas concentração-resposta cumulativas foram realizadas para vários agonistas: acetilcolina (ACh) (10⁻¹⁰ M - 3x10⁻⁵ M; relaxamento endotélio-dependente); nitroprussiato de sódio (NPS) (10⁻¹¹ M - 10⁻⁵ M; doador de NO) e sildenafil (10⁻¹¹ M - 10⁻⁵ M; inibidor da fosfodiesterase-5).

Para avaliar o relaxamento NANC as tiras de CC foram incubadas respectivamente com guanetidina (3x10⁻⁵ M) e atropina (10⁻⁶ M) durante 45 minutos e, após a incubação, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (3x10⁻⁵ M) e submetidos ao estímulo por campo elétrico (ECE). O ECE foi aplicado às tiras de CC colocadas entre eletrodos de platina, os quais estão acoplados a uma unidade distribuidora de estímulo elétrico (Stimu-Splitter II) que foi conectada à um estimulador elétrico Grass S88 (Astro-Med, West Warwick, RI, EUA). Pulsos elétricos foram aplicados na tensão de 20V, com duração e intervalo de pulso de 1 ms e nas seguintes frequências: (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64 Hz). A duração total de cada estímulo foi de 10s.

Para avaliar as respostas contráteis, as tiras de CC foram submetidas a curvas concentração-resposta cumulativas para fenilefrina (PE) (10⁻⁹ - 3x10⁻⁵) antes e após a incubação com atropina (10⁻⁶ M) e L-NAME (10⁻⁴ M) por 45 minutos.

Para avaliar a contratilidade mediada pelo simpático, as tiras de CC foram estimuladas por ECE e, logo após, incubadas com atropina (10⁻⁶ M) e L-NAME (10⁻⁴ M) durante 45 minutos e, após a incubação, os tecidos foram novamente submetidos ao ECE.

Ao final dos procedimentos foi realizado contração para KCl 120 mM.

Estes procedimentos foram realizados em tiras de CC de animais WT, pré-incubadas com ET-1 (10^{-7} M) por 4 horas. Durante a incubação, a contração máxima foi avaliada foi avaliada de 5 em 5 minutos.

Após definida a concentração de ET-1 que promove alguma alteração na reatividade, utilizamos as tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-} afim de avaliar a contração induzida por PE (10^{-9} - 3×10^{-5}) e o relaxamento induzido por NPS (10^{-11} M- 10^{-5} M).

4.10. Análise estatística:

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste t de Student ou pelo teste de análise de variância de uma via (ANOVA de uma via), seguido do pós-teste Sidak ou Tukey de acordo com cada análise. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. As respostas contráteis foram representadas como a força desenvolvida a partir do tônus basal em millinewtons (mN) normalizadas pelo peso seco (g) de tiras individuais do CC em um determinado número n de experimentos. Por outro lado, as respostas de relaxamento foram expressas como a porcentagem de relaxamento em relação aos níveis de pré-contração induzidos pela fenilefrina. Curvas concentração-efeito foram submetidas à análise de regressão não-linear usando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Prism 6.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A potência dos agonistas e a resposta máxima foram expressas como pD₂ (logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima) e Emax (efeito máximo produzido pelo agonista), respectivamente. Análises estatísticas dos valores de Emax e pD₂ foram realizadas usando-se a regressão não-linear seguida pelo teste F ou teste “t” de Student.

5. Resultados (Parte 1)

5.1. Caracterização da cultura de CMLCC

A caracterização da cultura de CMLCC dos camundongos WT (**figura 7**) e NLRP3^{-/-} (**figura 8**) é realizada avaliando-se por imunofluorescência o fator de Von Willebrand, característico de células endoteliais (**figura 7A e 8A**) e a expressão de α -actina, proteína característica do músculo liso (**figura 7B e 8B**). Para melhor visualização das células, os núcleos são marcados com DAPI (**figura 7C e 8C**) e realizada a sobreposição das imagens (**figura 7D e 8D**).

Figura 7. Caracterização de CMLCC de camundongos WT. Imunofluorescência para Von Willebrand (A), fator característico de células endoteliais, α -actina (B), característica de células de músculo liso, e DAPI (C) para marcação de núcleo. Sobreposição das imagens em (D).

Figura 8. Caracterização de CMLCC de camundongos $NLRP3^{-/-}$. Imunofluorescência para Von Willebrand (A), fator característico de células endoteliais, α -actina (B), característica de células de músculo liso, e DAPI (C) para marcação de núcleo. Sobreposição das imagens em (D).

5.2. Expressão dos receptores ET_A e ET_B em CMLCC de animais WT e NLRP3^{-/-}

A figura 9 mostra a expressão dos receptores ET_A e ET_B nas CMLCC de animais WT e NLRP3^{-/-}. Não é possível observar qualquer diferença na expressão dos receptores ET_A (figura 9A) e ET_B (figura 9B) nas células provenientes dos diferentes camundongos.

Figura 9. Análise densitométrica dos receptores ET_A (A) e ET_B (B) em células de músculo liso do corpo cavernoso de camundongos WT (barra branca) e NLRP3^{-/-} (barra preta). As barras representam a média ± EPM dos valores de expressão protéica. N=3 – 4.

5.3. Efeitos da ET-1 sobre a ativação da caspase-1

As figuras 10 a 13 mostram o efeito da ET-1 na ativação da caspase-1, enzima envolvida na via do inflamassoma e que promove clivagem de citocinas inflamatórias como a IL-1β.

Na figura 10 verifica-se que os macrófagos - controle positivo, estimulados com LPS/nigericina apresentam atividade da caspase-1 muito aumentada quando comparada com as CMLCC sem estímulo – controle negativo, ou com LPS e LPS/nigericina. Em CMLCC, o LPS não é capaz de aumentar a atividade da caspase-1. Contudo, há uma tendência de aumento nas CMLCC incubadas com LPS e seguido de nigericina, em relação ao grupo sem estímulo. A incubação com ET-1 por 2 horas (10⁻⁹, 10⁻⁸ e 10⁻⁷ M), na presença de LPS ou veículo, não é capaz de aumentar a atividade da caspase-1 em comparação ao grupo sem estímulo. As imagens representativas estão demonstradas acima do gráfico de barras.

Figura 10. Análise densitométrica da expressão de caspase-1 e pró-caspase-1. Índice de ativação da caspase-1, em macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina. CMLCC de camundongos WT (barras brancas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 2 horas com estímulo prévio com LPS ou veículo. A expressão da β-actina também é determinada e usada como controle interno. As barras representam a média ± EPM dos valores de expressão protéica. N=4.

Do mesmo modo, na **figura 11**, verifica-se que os macrófagos, controle positivo, estimulados com LPS/nigericina apresentam atividade da caspase-1 muito aumentada quando comparada com as CMLCC sem estímulo – controle negativo, ou com LPS e LPS/nigericina. Em CMLCC, o LPS não é capaz de aumentar a atividade da caspase-1. No entanto, o LPS seguido de nigericina, aumenta a atividade em relação ao grupo sem estímulo. As incubações com ET-1 por 4 horas nas concentrações de 10⁻⁷ M e 10⁻⁸ M, previamente estimuladas respectivamente com LPS e veículo, apresentam uma tendência de aumento em relação ao

grupo sem estímulo. As incubações com ET-1 nas concentrações 10^{-9} M, previamente estimuladas com LPS ou veículo, 10^{-8} M, na presença de LPS ou 10^{-7} M com veículo, não são capazes de aumentar a atividade da caspase-1 em comparação ao grupo sem estímulo. As imagens representativas estão demonstradas acima do gráfico de barras.

Figura 11. Análise densitométrica da expressão de caspase-1 e pró-caspase-1. Índice de ativação da caspase-1, em macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina. CMLCC de camundongos WT (barras brancas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 4 horas com estímulo prévio com LPS ou veículo. A expressão da β -actina também é determinada e usada como controle interno. As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores de expressão protéica. *, $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle. N=4.

Na **figura 12** verifica-se que os macrófagos, controle positivo, estimulados com LPS/nigericina apresentam atividade da caspase-1 muito aumentada quando comparada com as CMLCC sem estímulo – controle negativo, ou com LPS e LPS/nigericina. Em CMLCC, o

LPS não é capaz de aumentar a atividade da caspase-1. Contudo, o LPS seguido de nigericina, aumenta a atividade em relação ao grupo sem estímulo. Quando as CMLCC incubadas por 24 horas com ET-1 previamente estimuladas com LPS ou veículo, verifica-se que há aumento significativo da atividade da caspase-1 na concentração de 10^{-7} M previamente estimuladas com LPS ou veículo, quando comparada em relação ao grupo sem estímulo. A concentração de 10^{-8} M com veículo apresenta uma tendência de aumento em relação ao grupo sem estímulo, porém não é estatisticamente significativo. As demais concentrações, 10^{-9} M previamente estimulada com LPS, ou veículo, e 10^{-8} M com LPS, não são capazes de aumentar a atividade da caspase-1 em comparação ao grupo sem estímulo. As imagens representativas estão demonstradas acima do gráfico de barras.

Figura 12. Análise densitométrica da expressão de caspase-1 e pró-caspase-1. Índice de ativação da caspase-1, em macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina. CMLCC de camundongos WT (barras brancas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 24 horas com estímulo prévio com LPS ou veículo. A expressão da β-actina também é determinada e usada como controle interno. As barras representam a média ± EPM dos valores de expressão protéica. *, p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle. N=4.

5.4. Efeitos da ET-1 sobre a ativação do NLRP3

A **figura 13** mostra a ativação da caspase-1 em macrófagos – controle positivo, CMLCC de camundongos WT e NLRP3^{-/-}. A atividade da caspase-1 em macrófagos está muito aumentada quando comparada com as CMLCC, quando estimulados com LPS/nigericina. Verifica-se que o estímulo prévio com ET-1 por 24 horas é capaz de aumentar significativamente a atividade da caspase-1 quando comparada em relação ao grupo sem estímulo – controle negativo, em CMLCC de camundongos WT. Contudo, o mesmo efeito

não está presente nas células de camundongos NLRP3^{-/-} quando comparadas com ou sem estímulo com ET-1. Observa-se também que há aumento significativo da atividade da caspase-1 nas CMLCC de camundongos WT estimuladas com LPS e/ou nigericina. As imagens representativas estão demonstradas acima do gráfico de barras.

Figura 13. Análise densitométrica da ativação da caspase-1. Macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina; CMLCC de camundongos WT (barras brancas) e NLRP3^{-/-} (barras cinzas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 24 horas. A expressão da β -actina também é determinada e usada como controle interno. As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores de expressão protéica. *p < 0,05 em relação ao respectivo grupo controle. N=4.

A **figura 14** mostra a expressão do NLRP3 em macrófagos – controle positivo e CMLCC de camundongos WT. A expressão do NLRP3 em macrófagos está muito aumentada quando comparada com as CMLCC, quando estimulados com LPS/nigericina. Verifica-se que

o estímulo prévio com ET-1 por 24 horas não é capaz de aumentar a expressão do inflamassoma NLRP3 quando comparada em relação ao grupo sem estímulo – controle negativo, em CMLCC de camundongos WT. As imagens representativas estão demonstradas acima do gráfico de barras. Observa-se também que não há aumento significativo da expressão do NLRP3 nas CMLCC estimuladas com LPS/nigericina.

Figura 14. Análise densitométrica da expressão do inflamassoma NLRP3. Macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina; CMLCC de camundongos WT (barras brancas) sem estímulo, LPS/nigericina ou com ET-1 por 24 horas. A expressão da β -actina também é determinada e usada como controle interno. As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores de expressão protéica. N=4.

A **figura 15** mostra a ativação da IL-1 β em macrófagos – controle positivo, CMLCC de camundongos WT e NLRP3^{-/-}. Verifica-se que o estímulo prévio com ET-1 por 24 horas é capaz de aumentar significativamente a expressão de IL-1 β ativa quando comparada em relação ao grupo sem estímulo em CMLCC de camundongos WT. Contudo, o mesmo efeito não está presente nas células de camundongos NLRP3^{-/-} quando comparadas com estímulo com ET-1 ou veículo. Observa-se também que há aumento significativo da atividade da IL-1 β

nas CMLCC estimuladas com LPS e/ou nigericina. As imagens representativas estão demonstradas acima do gráfico de barras.

Figura 15. Análise densitométrica da atividade da IL-1β. Macrófagos de camundongos WT (barra preta) estimulados por LPS/nigericina; CMLCC de camundongos WT (barras brancas) e NLRP3^{-/-} (barras cinzas) sem estímulo, com LPS, LPS/nigericina ou com ET-1 por 24 horas. A expressão da β-actina também é determinada e usada como controle interno. As barras representam a média ± EPM dos valores de expressão protéica. *p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle. N=4.

6. Resultados (parte 2)

6.1. Caracterização dos animais

6.1.1. Massa corpórea

A massa corporal dos camundongos NLRP3^{-/-} ($25,13 \pm 0,55$ g; n=10) e caspase1/11^{-/-} ($26,12 \pm 0,31$ g; n=5) não é estatisticamente diferente dos camundongos WT ($24,62 \pm 0,25$ g; n=17), como ilustrado na **figura 16**.

Figura 16. Massa corporal dos camundongos WT, NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-}. As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores da massa corpórea. N= 5-17.

6.1.2. Massa seca do CC

A massa seca dos CCs dos camundongos NLRP3^{-/-} ($1,60 \pm 0,25$ mg; n=11) e caspase1/11^{-/-} ($1,70 \pm 0,24$ mg; n=6) não é estatisticamente diferente daquela apresentada por camundongos WT ($1,82 \pm 0,12$ mg; n=21), como ilustrado na **figura 17**.

Figura 17. Massa seca dos CCs dos camundongos WT (barras brancas) e NLRP3^{-/-} (barras pretas) e caspase1/11^{-/-} (barras cinzas). As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores da massa seca do CC. N=6-21.

6.1.3. Massa dos órgãos

Como ilustrado na **figura 18**, a massa dos órgãos dos camundongos NLRP3^{-/-} não é estatisticamente diferente dos camundongos WT: coração (WT=8,48 $\pm$ 0,31 mg/mm; n=4 vs NLRP3^{-/-}=8,82 $\pm$ 0,54 mg/mm; n=6 vs caspase1/11^{-/-}= 7,64 $\pm$ 0,54 mg/mm; n=5) **figura 18A**; rins (WT=9,56 $\pm$ 0,51 mg; n=4 vs NLRP3^{-/-}=9,16 $\pm$ 0,22 mg, n=6 vs caspase1/11^{-/-}=10,56 $\pm$ 0,60 mg, n=5) **figura 18B**; baço (WT=4,01 $\pm$ 0,13 mg; n=4 vs NLRP3^{-/-}=3,60 $\pm$ 0,50 mg; n=6 vs caspase1/11^{-/-}=3,43 $\pm$ 0,27 mg; n=5) **figura 18C**; próstata (WT=9,90 $\pm$ 0,61 mg; n=4 vs NLRP3^{-/-}=9,25 $\pm$ 0,83 mg; n=6 vs caspase1/11^{-/-}=10,12 $\pm$ 0,94 mg; n=5) **figura 18D**.

Figura 18. Massa do coração (A), dos rins (B), do baço (C) e da próstata (D) de camundongos WT (barras brancas), NLRP3^{-/-} (barras pretas) e caspase1/11^{-/-} (barras cinzas). As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores da massa dos órgãos. N=4-6

6.2. Caracterização da reatividade do CC

Os valores de contração induzida por KCl (120 mM) são similares em tiras de corpo cavernoso de camundongos WT e NLRP3^{-/-}, como mostra a **figura 19**. Os dados também estão descritos na **Tabela 2**.

Figura 19. Contração induzida por KCl (120 mM) em tiras de CC de camundongos WT e NLRP3^{-/-}. Dados expressos como média ± EPM. N=6.

Para avaliar a presença de mudanças na contratilidade do corpo cavernoso em resposta à atividade simpática, tiras do corpo cavernoso são estimuladas por ECE. Em condições controle, ou seja, em ausência de quaisquer inibidores, não são observadas diferenças significativas na resposta contrátil ao ECE do CC entre os diferentes grupos experimentais (**Figura 20A**). Entretanto, a resposta contrátil produzida nesta situação é o resultado final da liberação não somente de NA de terminações nervosas simpáticas, mas também de neurotransmissores de terminações parassimpáticas (ACh, que pode levar à produção de NO por células endoteliais) e terminações nitrérgicas que liberam NO. Considerando isto, as tiras do corpo cavernoso são incubadas com atropina (10⁻⁶ M) e L-NAME (10⁻⁴ M) para avaliar somente a atividade adrenérgica simpática. Nestas condições, tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} apresentam aumento da resposta contrátil ao ECE nas frequências de 4, 8 e 16 Hz (**Figuras 20B**). Quando comparadas a contração induzida por ECE e tiras de CC de camundongos WT, antes e após a incubação com L-NAME e atropina não se verifica nenhuma alteração (**figura 20C**). Entretanto, as tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} apresentam aumento na resposta contrátil ao ECE nas frequências de 4, 8 e 16 Hz quando comparadas as respostas antes e após a incubação com L-NAME e atropina (**figura 20D**).

Figura 20. Curvas frequência-resposta a ECE em tiras de CC de camundongos WT e NLRP3^{-/-} em presença de veículo (A), ou L-NAME e atropina (B). Comparação entre as curvas de contração para ECE em tiras de CC antes e após a incubação com L-NAME e atropina em camundongos WT (C) e NLRP3^{-/-} (D). Dados expressos como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$ vs respectivo controle. N=5-6

As curvas para contração induzida pela PE em tiras de CC de camundongos WT e NLRP3^{-/-} não apresentaram diferença quando avaliadas antes (**figura 21A**) e após a incubação com L-NAME e atropina (**figura 21B**). L-NAME e atropina não produziram efeitos significativos na contração para PE em tiras de CC de camundongos WT (**figura 21C**). Contudo, houve aumento significativo na resposta contrátil a PE em tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} após a incubação com L-NAME e atropina (**figura 21D**). Os dados também estão descritos na **Tabela 2**.

Figura 21. Curvas concentração-efeito para PE em presença de veículo (A) ou L-NAME e atropina (B) em tiras de CC de camundongos WT e NLRP3^{-/-}. Comparação entre as curvas de contração para PE em tiras de CC antes e após a incubação com L-NAME e atropina em camundongos WT (C) e NLRP3^{-/-} (D). Dados expressos como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle. N=5-6

Tabela 2. Valores de Emáx (mN/g tecido seco) e pD₂ para contração induzida por PE e KCl em tiras de CC dos camundongos WT e NLRP3^{-/-}.

Agonista contrátil	WT	NLRP3 ^{-/-}
KCl 120 mM		
Emáx	271,00 ± 38,89	240,50 ± 28,90
PE		
pD ₂	6,11 ± 0,06	6,05 ± 0,09
Emáx	836,50 ± 99,33	748,40 ± 57,35
PE+L-NAME+atropina		
pD ₂	6,16 ± 0,10	6,17 ± 0,08
Emáx	928,20 ± 86,54	1202,00 ± 85,86*

Resultados representados como média ± EPM. *, p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle. N=5-6.

Como se observa na **figura 22**, as respostas de relaxamento NANC (**figura 22A**) e ACh (**figura 22B**) não são estatisticamente diferentes entre tiras de CC de camundongos WT e NLRP3^{-/-}. Há prejuízo no relaxamento mediado por NPS (**figura 22C**) em tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} em relação ao WT. As curvas de relaxamento para sildenafil (**figura 22D**) não são estatisticamente diferentes entre tiras de CC de camundongos WT e NLRP3^{-/-}. Os valores para o relaxamento induzido por ACh, NPS e sildenafil estão descritos na **Tabela 3**.

Figura 22. Curvas frequência-resposta para o relaxamento NANC (A), curvas concentração-efeito para ACh (B), NPS (C) e sildenafil (D), em tiras de CC de camundongos WT e NLRP3^{-/-}. Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e são calculados como a porcentagem de relaxamento produzido em relação a pré-contracção produzida pela fenilefrina (3×10^{-5} M). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. N=5-6

Tabela 3. Valores de $Emáx$ (%) e pD_2 das curvas concentração-efeito para o relaxamento induzido por ACh, NPS e sildenafil em tiras de CC dos camundongos WT e NLRP3^{-/-}.

Agente vasodilatador	WT	NLRP3 ^{-/-}
ACh		
pD_2	$7,27 \pm 0,10$	$7,26 \pm 0,11$
$Emáx$	$71,61 \pm 7,84$	$75,86 \pm 6,84$
NPS		
pD_2	$6,14 \pm 0,06$	$5,96 \pm 0,10$
$Emáx$	$80,02 \pm 2,45$	$63,11 \pm 5,23^*$
sildenafil		
pD_2	$7,14 \pm 0,18$	$6,64 \pm 0,17$
$Emáx$	$55,91 \pm 5,94$	$64,92 \pm 8,77$

Resultados apresentados como média $\pm$ EPM, *, $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle. n=3-6.

6.3. Reatividade do corpo cavernoso após incubação com ET-1

Os valores de contração induzida por KCl (120 mM), após a incubação com a ET-1, são similares em tiras de CC de camundongos WT veículo e WT ET-1 10^{-7} M, como mostra a **figura 23**. Os dados também estão descritos na **Tabela 4**.

Figura 23. Contração induzida por KCl (120 mM) em tiras de CC de camundongos WT incubadas previamente com ET-1 10^{-7} M ou veículo por 4 horas. Dados expressos como média $\pm$ EPM. N=6.

Na **figura 24**, observamos que a incubação com ET-1 promove um aumento na potência e no efeito máximo da contração induzida pela PE. Os dados estão descritos na **tabela 4**.

Figura 24. Curvas concentração-efeito para PE em tiras de CC de camundongos WT incubadas previamente com ET-1 10^{-7} M ou veículo por 4 horas. Dados expressos como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$ em relação grupo controle. N=4.

Tabela 4. Valores de $E_{m\acute{a}x}$ (mN/g tecido seco) e pD_2 para contração induzida por PE e KCl em tiras de CC dos camundongos WT veículo e WT ET-1 10^{-7} .

Agonista contrátil	WT veículo	WT ET-1 10^{-7} M
KCl 120 mM		
$E_{m\acute{a}x}$	$556,5 \pm 116,4$	$494,0 \pm 64,12$
PE		
pD_2	$6,19 \pm 0,04$	$6,55 \pm 0,08^*$
$E_{m\acute{a}x}$	$1097,28 \pm 45,16$	$1251,70 \pm 123,6$

Resultados apresentados como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. N=4-5.

Como se observa na **figura 25**, a resposta para o relaxamento NANC (**figura 25A**) é significativamente maior entre as frequências de 8 a 32 Hz em tiras de CC incubadas com ET-1 10^{-7} M quando comparadas com as tiras incubadas com veículo. O relaxamento induzido por ACh (**figura 25B**) não é estatisticamente diferente entre tiras de CC de camundongos WT incubadas por 4 horas com ET-1 10^{-7} M ou veículo. Há prejuízo no relaxamento mediado por NPS (**figura 25C**) em tiras de CC de camundongos WT incubadas com ET-1 quando comparadas com as tiras incubadas com veículo. As curvas para o sildenafil (**figura 25D**) não são estatisticamente diferentes entre tiras de CC incubadas com ET-1 e veículo. Os dados estão descritos na **tabela 5**.

Figura 25. Curvas frequência-resposta para o relaxamento NANC (A), curvas concentração-efeito para ACh (B), NPS (C) e sildenafil (D), em tiras de CC de camundongos WT veículo e WT ET-1 10^{-7} M. Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e são calculados como a porcentagem de relaxamento produzido em relação a pré-contracção produzida pela fenilefrina (3×10^{-5} M). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. N=4

Tabela 5. Valores de $Emáx$ (%) e pD_2 das curvas concentração-efeito para NPS em tiras de CC dos camundongos WT veículo e WT ET-1 10^{-7} M.

Agente vasodilatador	WT veículo	WT ET-1 10^{-7} M
ACh		
pD_2	$7,09 \pm 0,08$	$7,35 \pm 0,15$
$Emáx$	$59,13 \pm 5,40$	$61,96 \pm 9,94$
NPS		
pD_2	$7,10 \pm 0,12$	$6,80 \pm 0,14^*$
$Emáx$	$93,84 \pm 3,77$	$77,22 \pm 4,06^*$
sildenafil		
pD_2	$8,54 \pm 0,17$	$8,23 \pm 0,14$
$Emáx$	$87,10 \pm 4,43$	$77,91 \pm 1,35$

Resultados apresentados como média $\pm$ EPM, *, $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle. $n=4$.

Após a definição dos efeitos promovidos pela ET-1 na reatividade de tiras de CC, verificou-se a contribuição do NLRP3 e da caspase-1 e caspase-11 para os mesmos.

Inicialmente comparou-se a contração induzida por ET-1 10^{-7} M, nas tiras de CC de camundongos WT, NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-} durante o período de incubação com ET-1. O efeito máximo promovido pela ET-1, **figura 26A**, e também o tempo que o tecido permanece contraído, **figura 26B**, são significativamente menores nas tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-}. Os dados estão descritos na **Tabela 6**.

Figura 26. Contração (**A**) e a duração da contração (**B**) induzida por ET-1 10^{-7} M em tiras de CC de camundongos WT, NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-}. Dados expressos como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle. $N=4-6$.

Tabela 6. Valores de Em_{áx} (mN/g tecido seco) para contração induzida por ET-1 em tiras de CC dos camundongos NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-}.

Agonista contrátil	WT ET-1 10 ⁻⁷ M	NLRP3 ^{-/-} ET-1 10 ⁻⁷ M	Caspase1/11 ^{-/-} ET-1 10 ⁻⁷ M
ET-1 10 ⁻⁷			
Em _{áx}	811,40 ± 67,86	508,10 ± 48,65*	466,90 ± 55,10*

Resultados representados como média ± EPM. *, p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle. N=5-6.

Os valores de contração induzida por KCl (120 mM) são similares em tiras de CC de camundongos WT, NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-} após a incubação por 4 horas com ET-1 10⁻⁷ M ou veículo como mostra a **figura 27**. Os dados estão descritos na **Tabela 7**.

Figura 27. Contração induzida por KCl (120 mM) em tiras de CC de camundongos WT, NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-} incubadas com ET-1 10⁻⁷ M ou veículo por 4 horas. Dados expressos como média ± EPM. N=4-6.

A incubação com ET-1 não promove aumento da resposta contrátil induzida por PE em tiras do CC de camundongos NLRP3^{-/-} (**figura 28A**) e caspase1/11^{-/-} (**figura 28B**). As curvas para contração induzida pela PE nas tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-} também não são diferentes quando comparadas com o grupo controle (**figura 28C**) incubadas com veículo. Este aumento não é observado para as tiras de caspase1/11^{-/-}. Os dados estão descritos na **Tabela 7**.

Figura 28. Curvas concentração-efeito para PE em tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} (A) e caspase1/11^{-/-} (B) incubadas previamente com ET-1 10⁻⁷ M ou veículo por 4 horas. Curvas concentração-efeito para PE em tiras de CC de camundongos WT, NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-} incubadas 4 horas com veículo (C). Dados expressos como média ± EPM. N=4.

Tabela 7. Valores de Emáx (mN/g tecido seco) e pD₂ para a contração induzida por KCl e PE em tiras de CC dos camundongos NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-}.

Agonista contrátil	WT veículo	WT ET-1 10 ⁻⁷ M	NLRP3 ^{-/-} veículo	NLRP3 ^{-/-} ET-1 10 ⁻⁷ M	Caspase1/1 1 ^{-/-} veículo	Caspase1/1 1 ^{-/-} ET-1 10 ⁻⁷ M
KCl 120 mM						
Emáx	556,5 ± 116,4	494,0 ± 64,12	581,70 ± 89,30	516,90 ± 74,49	633,20 ± 65,53	611,00 ± 44,66
PE						
pD ₂	6,19 ± 0,04	6,55 ± 0,08*	6,48 ± 0,12	6,63 ± 0,08	6,25 ± 0,10	6,44 ± 0,12
Emáx	1097,28 ± 45,16	1251,70 ± 123,6	1119,00 ± 123,80	1125,00 ± 123,80	1034,00 ± 106,10	985,40 ± 135,40

Resultados apresentados como média ± EPM.

A incubação com ET-1 não promoveu prejuízo no relaxamento induzido por NPS em tiras do CC de camundongos NLRP3^{-/-} (**figura 29A**) e caspase1/11^{-/-} (**figura 29B**). Contudo, quando comparadas as respostas de tiras de CC de camundongos WT em relação as de NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-} (**figura 29C**) incubadas com veículo, observa-se que ambas possuem um prejuízo no relaxamento quando comparadas com as tiras de CC de camundongos WT. Os dados estão descritos na **Tabela 8**.

Figura 29. Curvas concentração-efeito para o relaxamento induzido por NPS em tiras de CC de camundongos NLRP3^{-/-} (A) e caspase1/11^{-/-} (B) incubadas previamente com ET-1 10⁻⁷ M ou veículo por 4 horas. Curvas concentração-efeito para NPS em tiras de CC de camundongos WT, NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-} incubadas 4 horas com veículo (C). Dados expressos como média ± EPM. *, p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle. N=4.

Tabela 8. Valores de Emáx (%) e pD₂ para o relaxamento produzido por NPS em tiras de CC dos camundongos NLRP3^{-/-} e caspase1/11^{-/-}.

Agonista contrátil	WT veículo	WT ET-1 10 ⁻⁷ M	NLRP3 ^{-/-} veículo	NLRP3 ^{-/-} ET-1 10 ⁻⁷ M	Caspase1/1 1 ^{-/-} veículo	Caspase1/1 1 ^{-/-} ET-1 10 ⁻⁷ M
NPS						
pD ₂	7,10 ± 0,12	6,80 ± 0,14*	6,40 ± 0,08 *	6,57 ± 0,11 *	6,45 ± 0,09 *	6,52 ± 0,12 *
Emáx	93,84 ± 3,77	77,22 ± 4,06*	83,43 ± 6,01	80,24 ± 3,23	90,22 ± 7,66	93,83 ± 3,61

Resultados representados como média ± EPM. *, p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle. N=5-6.

7. Discussão

Os resultados do presente estudo indicam que o NLRP3, um importante membro do sistema imune inato com participação fundamental no processo inflamatório, exerce um papel na contração induzida pela ET-1, bem como no aumento da resposta a outros agonistas contráteis promovido pela ET-1 no MLCC. O NLRP3 possui importância muito grande no sistema cardiovascular, uma vez que as células vasculares são capazes de detectar e responder a DAMPs ou PAMPs via TLRs e NLRs e assim promover liberação de citocinas, quimiocinas e hormônios dilatadores (FOLDES *et al.*, 2010; SCHULTZ *et al.*, 2007), que facilitam a transferência e migração de leucócitos para o sítio da lesão (TOUSOULIS *et al.*, 2008). Com isso, podemos dizer que nossos dados são essenciais para o entendimento de mecanismos que ainda carecem de elucidação, tais como a ET-1 promove liberação de marcadores inflamatórios, e como estes participam na gênese da DE.

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

Considerando esses fatos, os experimentos realizados foram divididos em duas etapas distintas, porém complementares: a primeira avaliamos o efeito da incubação com ET-1 em CMLCC na ativação do NLRP3 e consequente ativação da caspase-1 e maturação de IL-1 β ; na segunda etapa realizamos inicialmente a caracterização da reatividade do corpo cavernoso nos camundongos controle ou deficientes para o receptor NLRP3. Após, observamos os efeitos da incubação com ET-1 em tiras do CC de animais controle afim de constataremos se haveria algum prejuízo, em seguida verificamos se os mesmos prejuízos persistiriam nas tiras de CC dos animais deficientes para NLRP3 e caspase-1 e caspase-11.

Inicialmente, averiguamos a expressão dos receptores ET_A e ET_B nas CMLCC derivadas de camundongos controle ou deficientes de NLRP3. Embora o papel, a expressão e a

função dos receptores para ET-1 no CC já estão bem esclarecidos (RITCHIE e SULLIVAN, 2001). A ET-1 induz constrição no corpo cavernoso predominantemente através da ativação de receptores ET_A e de vias de sinalização como RhoA/Rho cinase e ERK 1/2. Os receptores ET_B medeiam principalmente vasodilatação via estímulo da eNOS em células endoteliais, aumentando assim a biodisponibilidade de NO (CARNEIRO *et al.*, 2008b). Este experimento foi realizado afim excluir qualquer interferência nos resultados por diferenças na expressão destes receptores entre as linhagens de animais utilizados.

Após demonstrarmos que não havia diferença na expressão dos receptores ET_A e ET_B, realizamos a incubação de CMLCC com ET-1 para testar a hipótese de que este peptídeo ativa os receptores NLRP3. Entretanto, como um controle adicional, utilizamos para este experimento macrófagos estimulados com LPS e nigericina, pois estas células são consideradas a maior fonte de IL-1 β , e apresentam significativa expressão e função da plataforma inflamassoma. Da mesma forma, células vasculares, como CMLV e células endoteliais, também podem produzir IL-1 β e outras citocinas em menor quantidade (MENU *et al.*, 2011). Isto indica que estas células podem expressar e ativar componentes do inflamassoma, porém em menor quantidade. Como relatado, observamos uma grande diferença na expressão da caspase-1 ativa quando comparamos macrófagos e CMLCC estimulados com LPS e nigericina. Isto demonstra que embora os receptores do sistema imune estejam presentes em diferentes tecidos, a sua participação na modulação do processo inflamatório é bem menor do que em macrófagos, células dendríticas ou neutrófilos.

Observamos, por meio de western blot, que a ET-1, com estímulo prévio com LPS ou veículo, promove clivagem da caspase-1 de modo tempo-dependente (2, 4 ou 24 horas) e concentração-dependente em CMLCC. A incubação prévia com LPS deve-se devido a expressão basal de NLRP3 não ser suficiente para a formação do complexo do inflamassoma e ativação da caspase-1 em células não estimuladas (BAUERNFEIND *et al.*, 2009; FRANCHI *et al.*, 2009a). Dessa forma, para a maturação e liberação de IL-1 β pelo menos dois sinais são necessários: o primeiro sinal é responsável pela ativação da via TLR/NF- κ B que culmina na síntese dos substratos utilizados pelo inflamassoma, como a pró-caspase-1, a pró-IL-1 β e a pró-IL-18. O segundo sinal ativa o NLRP3 e recruta outras proteínas para a montagem da plataforma molecular chamada de inflamassoma, o que então leva à formação e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Em outras palavras, o primeiro sinal induz a transcrição gênica das formas precursoras das citocinas e prepara a maquinaria para responder

a um sinal inflamatório, ao passo que o segundo sinal leva à clivagem das citocinas em sua forma ativa e à sua posterior secreção. (HORVATH *et al.*, 2011).

Entretanto, no tempo de 24 horas, verificamos que a ativação da caspase-1 pela ET-1 não depende de estímulo prévio com LPS. Isto ocorre devido a ET-1 ativar fatores de transcrição como NF- κ B, em CMLV, o que é responsável por liberar TNF- α e IL-6 e também é responsável pela produção das formas inativas de citocinas como a pró-IL-1 β e a pró-IL-18, não necessitando de um primeiro sinal (YEAGER *et al.*, 2012). Além disso, já foi demonstrado que há aumento da atividade da caspase-1 no rim de animais DOCA/sal, um modelo de hipertensão arterial experimental que apresenta aumento da concentração plasmática de ET-1 quando comparado a seu respectivo controle (KRISHNAN *et al.*, 2015). Este aumento na concentração plasmática de ET-1 promove prejuízo na reatividade do CC e, conseqüentemente, leva à DE (CARNEIRO *et al.*, 2008a; CARNEIRO *et al.*, 2008b).

De fato, a incubação com a ET-1 promove aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF- α (BROWATZKI *et al.*, 2000), além de outros marcadores como VCAM-1 (LIN *et al.*, 2015) em CMLV. Além disso, já está claro que a ET-1 desempenha um papel crucial na modulação do processo inflamatório crônico em diversas doenças humanas, como doença renal crônica (SALEH E POLLOCK, 2011; KOHAN E BARTON, 2014), asma (WENG *et al.*, 2013; COYLE E METERSKY, 2013) e sepse (KOWALCZYK *et al.*, 2015), por meio da modulação do sistema imune. A ET-1 ativa diretamente neutrófilos e promove a quimiotaxia através da ativação de fatores como proteína quimioatrativa de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1* – MCP-1), ICAM-1 e VCAM-1 (SALEH E POLLOCK, 2011). Entretanto, os mecanismos pelos quais a ET-1 induz a ativação do sistema imune inato e adaptativo ainda não foi completamente elucidado. Uma possível explicação seria através da ativação da caspase-1 e liberação de citocinas pró-inflamatórias, por meio do NLRP3.

A caspase-1 é responsável por clivar a IL-1 β e IL-18 em resposta a DAMPs ou PAMPs. Os membros da família NLR são responsáveis pela ativação da caspase-1, através da proteína ASC ou ligando-se diretamente através de seu domínio CARD (FRANCHI *et al.*, 2009b; MARIATHASAN, 2007; MARTINON *et al.*, 2009). Após constatarmos que a ET-1 promove clivagem da caspase-1, o próximo passo foi investigar se essa ativação ocorre via NLRP3.

Verificamos que a incubação com ET-1 não é capaz de aumentar a expressão do NLRP3. Contudo, quando utilizamos CMLCC de camundongos deficientes para NLRP3,

constatamos que a ET-1 não aumenta a expressão da caspase-1 como ocorre nas células de animais controle. Este resultado sugere que o NLRP3 exerce um papel crucial na ativação da caspase-1 induzida pela ET-1 em CMLCC. De fato, além da ativação de NF- κ B, que é considerado um primeiro sinal para ativação do NLRP3, a ET-1 também eleva a produção de ROS em CMLV, como observado em artérias penianas de ratos Zucker obesos (SANCHEZ *et al.*, 2014). A ET-1 também promove aumento de ROS mitocondrial, como mostrado por DE GIUSTI e colaboradores (2008), em miócitos ventriculares através do aumento do efluxo de prótons, mediado por trocadores Na(+)/H(+), possivelmente através do aumento de O₂⁻ (ZENG *et al.*, 2008). Este também é conhecido como um segundo sinal para ativação do NLRP3 (MARIATHASAN e MONACK, 2007).

Além disso, a ação da ET-1 é, em grande parte, dependente da concentração de Ca²⁺ intracelular. Isto ocorre diferentemente em cada tecido, através da ativação de canais extracelulares ou liberando as reservas intracelulares de Ca²⁺ (TYKOCKI e WATTS, 2010). No CC de roedores, a ação da ET-1 ocorre devido a ativação de receptores ET_A que promovem ativação da via de sinalização IP₃/Ca²⁺ e RhoA/Rho cinase (WINGARD *et al.*, 2003). Aumento na concentração de Ca²⁺ também é considerado como um ativador do NLRP3, pois o uso de quelante de Ca²⁺ reduz expressivamente a atividade da caspase-1 em macrófagos de camundongos (LEE *et al.*, 2012).

A ET-1 também induz o aumento na maturação de IL-1 β nas CMLCC de camundongos controle. Porém, o mesmo efeito não foi observado nas células dos animais que apresentam deficiência para o receptor NLRP3. De fato, evidências científicas mostram que a ET-1 promove liberação de citocina pró-inflamatória, como IL-1 β , em monócitos (HELSET *et al.*, 1993), em células de ligamentos periodontais (LIANG *et al.*, 2014), em células endoteliais e CMLV (KOWALCZYK *et al.*, 2015). Com base nisto, nossos dados nos permitem concluir que o NLRP3 participa da resposta inflamatória produzida pela ET-1 em CMLCC.

Após verificarmos que ET-1 produz ativação da caspase-1 nas CMLCC e que o NLRP3 é o mecanismo para este efeito, realizamos estudos de reatividade do CC afim de verificar se a ativação do NLRP3 pela ET-1 seria capaz de promover mudanças na função do tecido cavernoso. Contudo, antes disso, como um controle adicional, fez-se necessário averiguar quaisquer alterações promovidas pela deficiência do NLRP3 na reatividade do CC.

Nos experimentos de reatividade, observamos que a ausência do NLRP3 não promove aumento da atividade contrátil em tiras do CC quando submetidas ao estímulo por campo

elétrico. Entretanto, quando a sintase de óxido nítrico foi inibida juntamente com o antagonismo de receptores colinérgicos, observou-se um aumento na contração induzida por ECE e por PE, sugerindo que pode haver aumento do tônus parassimpático ou simpático, respectivamente através de neurônios colinérgicos e/ou nitrérgicos e noradrenérgicos, da eNOS nos CC de animais deficientes para NLRP3.

A deficiência do receptor NLRP3 poderia aumentar a atividade sistema nervoso simpático. O sistema nervoso simpático também tem a função de monitorar e regular a resposta imunológica. Isto ocorre periféricamente através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , que é a via final da ativação do NLRP3, além de IL-6 e TNF α , que sinalizam para o sistema nervoso central por duas vias: através da circulação (STEINMAN, 2004) ou através das fibras do nervo vago (BLUTHE *et al.*, 1994; WATKINS *et al.*, 1995). Portanto o aumento no tônus simpático ocorreria de modo promover aumento resposta imunológica para suprir a ausência do NLRP3.

Uma outra explicação possível seria que o NLRP3 pode modular negativamente a atividade da eNOS e do tônus parassimpático. O tônus parassimpático também tem como função atenuar a inflamação sistêmica (BOROVIKOVA *et al.*, 2000). Com base nisto podemos afirmar que o aumento no tônus parassimpático destes animais ocorreria de modo a atenuar este aumento no processo inflamatório. Após constatarmos os efeitos da deleção do NLRP3 na reatividade do CC, verificamos se as alterações promovidas pela ET-1 na reatividade eram mediadas pelo NLRP3 no CC, e se isso promoveria aumento na contração e/ou prejuízo no relaxamento.

O aumento na contração induzida por ECE e PE, ocorreria, pois, a deficiência do receptor NLRP3 poderia elevar outros marcadores inflamatórios, como outros membros da família TLR, NLR ou também da caspase-11, que levariam a formação da plataforma inflamassoma e promoveriam clivagem da caspase-1 e maturação de IL-1 β (KANG *et al.*, 2000; BROZ e MONACK, 2013) e esta é crucial para o controle do tônus do CC (IKEDA *et al.*, 1990).

Estes experimentos foram realizados inicialmente com camundongos controle, afim de determinar os efeitos promovidos pela incubação ET-1 na reatividade do CC. Após definir as alterações promovidas pela ET-1, os mesmos experimentos foram realizados com CC de camundongos deficientes para o receptor NLRP3 e para caspase1 e caspase-11 para verificar se a ativação destas vias contribui para os efeitos produzidos pela ET-1 no CC.

Os camundongos deficientes na formação da caspase-1 também são deficientes em caspase-11, e ainda não existe na literatura dados suficientes para explicar o papel da caspase-11 nas diferentes respostas imunológicas (KAYAGAKI *et al.*, 2011), principalmente na vasculatura e no CC. A caspase-11 em camundongos (um ortólogo da caspase-4 e caspase-5 humanas) promove a ativação da caspase-1 em resposta principalmente a infecção por patógenos, como bactérias gram-negativas, sendo considerada como ativação não-canônica da via do inflamassoma. (KAYAGAKI *et al.*, 2011). Portanto os efeitos observados neste estudo podem ocorrer tanto devido a deficiência da caspase-1 quanto da caspase-11.

Durante a incubação de tiras de CC com ET-1, mesmo com uma concentração que não produz efeito máximo, observamos uma contração potente nas tiras de CC de camundongos controle, e este efeito foi reduzido em CC de camundongos deficientes para NLRP3 e para caspase-1 e caspase-11. Desde a sua descoberta em 1989, a ET-1 é conhecida como um peptídeo derivado do endotélio, capaz de promover contração potente sustentada (YANAGISAWA *et al.*, 1989). Suas principais funções são, regular o equilíbrio hidroeletrolítico do organismo, auxiliando a homeostase da pressão arterial, e estimular o sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Estas ações fazem da ET-1 um mediador importante na hipertensão arterial, aterosclerose, disfunção renal, insuficiência cardíaca (AGAPITOV e HAYNES, 2002) e na DE (CARNEIRO *et al.*, 2008b). Com base em nossos resultados, podemos ter uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na potente contração induzida pela ET-1.

Possivelmente o mecanismo contrátil da ET-1 no CC ocorre parcialmente devido a ação da caspase-1 e consequente liberação de IL-1 β , por meio da ativação do NLRP3. Já foi demonstrado que o aumento da geração de ROS, que é um importante ativador do NLRP3, no MLCC, em modelo de consumo crônico de etanol eleva a potência contrátil da ET-1 (MUNIZ *et al.*, 2015). O aumento na produção de ROS, por meio da ativação de PI3K/Akt e ERK 1/2, estimula a ativação do NLRP3 e, consequentemente, a liberação de IL-1 β (CRUZ *et al.*, 2007). Considerando que a ET-1 atua como um modulador importante da inflamação crônica no leito vascular, causando liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6, além de aumentar a interação de células endoteliais vasculares e macrófagos (HELSET *et al.*, 1993), podemos concluir que a resposta máxima e a duração da contração induzida pela ET-1 no CC dependem parcialmente da presença do NLRP3, caspase-1 e/ou da caspase-11. Embora os nossos dados apontem para esta possível modulação do NLRP3, caspase-1 e/ou caspase-11 na resposta contrátil da ET-1 no CC, estes resultados devem ser interpretados de maneira cautelosa, uma

vez que, no presente estudo, não investigamos alterações estruturais teciduais que possam interferir no efeito contrátil da ET-1.

A contração mediada pela ET-1 ocorre devido a ativação da via da RhoA/RhoK, e esta apresenta uma relação inversa com a liberação de NO no CC, como foi demonstrado em modelo de consumo abusivo de etanol (LEITE *et al.*, 2007), onde a RhoK é responsável pela supressão da atividade da eNOS no CC (BIVALACQUA *et al.*, 2004). Além disso, o NO promove relaxamento no CC através da redução da potência da contração induzida por proteínas contráteis (LEITE *et al.*, 2007). Também foi demonstrado por Carneiro e colaboradores (2008a), que em modelo de hipertensão DOCA-sal, que apresenta como principal característica o aumento na concentração de ET-1 no plasma, ocorre aumento na contração induzida por PE e ECE em tiras de CC.

Além disso, a incubação com ET-1 aumentou a potência para a contração promovida pela PE nas tiras de CC de camundongos controle. Contudo, o mesmo procedimento não promoveu tal alteração em tiras de CC deficientes de NLRP3 ou para caspase-1 e caspase-11. Alguns estudos mostram que o aumento da ET-1 no plasma potencializa o efeito contrátil produzido por NA em artérias humanas (YANG *et al.*, 1990), leito mesentérico de ratos (TABUCHI *et al.*, 1989), além de elevar a potência da contração mediada por receptores α -1 adrenérgicos no CC de ratos (KIM *et al.*, 1996; WINGARD *et al.*, 2003). O mecanismo envolvido no aumento da sensibilidade a PE, deve-se à atividade da RhoA/Rho cinase e ERK 1/2 promovido pela ET-1 no CC (CARNEIRO *et al.*, 2008b).

A ERK 1/2, estimula a ativação da caspase-1, através do NLRP3 e, consequentemente, a liberação de IL-1 β (CRUZ *et al.*, 2007). A ET-1 também é responsável pelo aumento de marcadores inflamatórios (PARISSIS *et al.*, 2002), como citocinas pró-inflamatórias. Estas, possuem um papel fundamental no controle do tônus vascular, como a IL-1 β , que promove crescimento anormal de CMLV (IKEDA *et al.*, 1990), além de estimular a quimiotaxia de CMLV de uma maneira dependente de Ca²⁺ (NOMOTO *et al.*, 1988). Isto reforça a nossa hipótese de que os mecanismos pelos quais a ET-1 promove alterações no CC e levam a DE ocorrem em grande parte devido a ativação do NLRP3.

Contrariamente ao esperado, a incubação com ET-1 promoveu aumento no relaxamento mediado por estímulo NANC e não alterou o relaxamento dependente de endotélio. Uma explicação possível para esse fenômeno seria o aumento da produção de NO nas células endoteliais, via ativação de receptores ET_B, neste período de incubação. Este mecanismo ocorre devido aos receptores ET_B ativarem PI3K/Akt, que por sua vez estimulam

a fosforilação da eNOS (HERRERA *et al.*, 2009). ET_B também aumenta a atividade da nNOS através de diferentes cinases, como cinase de cálcio calmodulina (*calcium calmodulin kinase* – CaMK), PKC e PKA (NUNZIO *et al.*, 2002; JAUREGUIBERRY *et al.*, 2004).

Entretanto, a ET-1 promoveu prejuízo no relaxamento mediado por NPS em tiras de CC de animais WT. Este fato poderia ocorrer, devido a ET-1 induzir, além da ativação da via da RhoA/RhoK, a formação de ROS, que pode reduzir a biodisponibilidade de NO pela formação de peroxinitrito. Alguns estudos mostram que a ET-1 aumenta a produção de ânion superóxido (O₂⁻) na aorta de ratos, via ativação de receptores ET_A (GALLE *et al.*, 2000), e que a geração de O₂⁻ ocorre devido à estimulação da NAD(P)H oxidase (LI *et al.*, 2003). A ET-1 aumenta a expressão da gp91^{phox}, subunidade limitante da velocidade da NAD(P)H oxidase (MOHAZZAB *et al.*, 1994), e da subunidade p22^{phox} (KAMATA *et al.*, 2004), além de estimular a produção de ROS em CMLV (WEDGWOOD *et al.*, 2001). O aumento na geração de ROS induz a ativação de NLRP3, elevando assim a liberação e maturação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e IL-18 (MARIATHASAN, 2007; MARTINON *et al.*, 2009).

A ET-1 também promove aumento na liberação de TNF-α em CMLV (BROWATZKI *et al.*, 2000). Esta citocina aumenta a atividade da NAD(P)H oxidase elevando assim a produção de ROS que, por sua vez, aumenta a produção e liberação de quimiocinas e citocinas, levando a um ciclo vicioso na inflamação. Diversos fatores podem interferir com a atividade da NAD(P)H oxidase, como a angiotensina II, ET-1, altas concentrações de glicose e altos níveis de colesterol, estímulos esses que estão também envolvidos na ativação do NLRP3 (HOFFMAN e BRYDGES, 2011).

As citocinas também promovem aumento da liberação de ROS em sítios de inflamação. As ROS em altas concentrações podem promover injúria e morte celular. Células endoteliais são os principais alvos do estresse oxidativo, que possui um papel crucial na fisiopatologia de doenças vasculares. Além da NAD(P)H oxidase, uma importante fonte na geração de ROS é a mitocôndria, sua produção se dá como subprodutos durante a produção de ATP via transferência de elétrons através do citocromo C (GRIENDLING *et al.*, 2000).

Além de sua função na geração de O₂⁻, a NAD(P)H oxidase também regula a expressão da PDE5. A PDE5 tem grande potencial inflamatório, pois esta regula a via do NO-GMPc. A via do NO-GMPc promove relaxamento nas células de músculo liso e também inibe a atividade e/ou expressão da NAD(P)H oxidase e consequente liberação de TNF-α, além de suprimir ativação do NF-κB, no CC (HOTSTON *et al.*, 2007). Esta é uma possível explicação

para o prejuízo no relaxamento para o NPS nas tiras de CC pode ser devido ao aumento da PDE5, pois como observado quando nas curvas para o relaxamento mediado pelo sildenafil, não há diferença entre as tiras de CC incubadas com ET-1 ou veículo.

De fato, o uso de inibidores da PDE5 apresenta benefícios para os efeitos crônicos e agudos apresentados na DE (MORANO *et al.*, 2007), bem como na função arterial (VLACHOPOULOS *et al.*, 2003; VLACHOPOULOS *et al.*, 2004) e cardíaca (HIRATA *et al.*, 2005) de pacientes com DE. Estes benefícios são atribuídos as propriedades antiinflamatórias da inibição da PDE5. Uma vez que, o tratamento por 12 semanas com antioxidantes combinado com o sildenafil reduz a expressão de ICAM-1 e o dano no endotélio do CC em pacientes com diabetes e DE (MORANO *et al.*, 2007). Além disso, o tratamento por 3 semanas com tadalafil melhora o relaxamento dependente de endotélio na artéria cavernosa de homens com DE (AVERSA *et al.*, 2007). Acompanhado dos efeitos benéficos na função endotelial, bem como anti-inflamatórios, através da redução de VCAM-1 e ICAM-1, ET-1 e proteína C reativa, o tadalafil também reduz significativamente a liberação de TNF- α e IL-1 β , como observado em artérias pulmonares isoladas de ratos (TSAI *et al.*, 2006). A PDE5 está intimamente ligada com a liberação de mediadores e citocinas pró-inflamatórias, isto possivelmente está ligado ao aumento da atividade do NLRP3.

Considerando que, as citocinas, como a IL- β , que é produto final da ativação do NLRP3, tem efeitos específicos na vasculatura, em células endoteliais, CMLV e na matriz extracelular, como a regulação do tônus vascular, além da sinalização de vias que promovem vasoconstrição e/vasodilatação, crescimento celular e proliferação, levando a mudanças estruturais no leito vascular (SPRAGUE e KHALIL, 2009). Considerando que o CC possui estruturas similares ao leito vascular, as alterações estruturais promovidas pela ativação do NLRP3 podem promover aumento na liberação de citocinas e consequentemente pode levar à DE.

8. Conclusão

Os resultados obtidos indicam que a ET-1 induz ativação da caspase-1 e, consequentemente, liberação de IL-1 β em CMLCC através da ativação de NLRP3, levando a alterações na reatividade do CC, com aumento da contração e prejuízo no relaxamento.

9. Referências

- NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. JAMA, v. 270, n. 1, p. 83-90, Jul 7 1993.
- AGAPITOV, A. V.; HAYNES, W. G. Role of endothelin in cardiovascular disease. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, v. 3, n. 1, p. 1-15, Mar 2002.
- ALLAHDADI, K. J. et al. Endothelin-1 induces contraction of female rat internal pudendal and clitoral arteries through ET(A) receptor and rho-kinase activation. J Sex Med, v. 7, n. 6, p. 2096-103, Jun 2010.
- ALONSO, D.; RADOMSKI, M. W. The nitric oxide-endothelin-1 connection. Heart Fail Rev, v. 8, n. 1, p. 107-15, Jan 2003.
- AMIRI, F. et al. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. Circulation, v. 110, n. 15, p. 2233-40, Oct 12 2004.
- ANDERSSON, K. E. Pharmacology of penile erection. Pharmacol Rev, v. 53, n. 3, p. 417-50, Sep 2001.
- ANDERSSON, K. E. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. Pharmacol Rev, v. 63, n. 4, p. 811-59, Dec 2011.
- ANDERSSON, K. E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. Physiol Rev, v. 75, n. 1, p. 191-236, Jan 1995.
- ANGGRAHINI, D. W. et al. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. Cardiovasc Res, v. 82, n. 1, p. 143-51, Apr 1 2009.
- ARANA ROSAINZ MDE, J. et al. Imbalanced low-grade inflammation and endothelial activation in patients with type 2 diabetes mellitus and erectile dysfunction. J Sex Med, v. 8, n. 7, p. 2017-30, Jul 2011.
- ARI, G. et al. Possible role for endothelins in penile erection. Eur J Pharmacol, v. 307, n. 1, p. 69-74, Jun 20 1996.
- AVERSA, A. et al. Relationship between chronic tadalafil administration and improvement of endothelial function in men with erectile dysfunction: a pilot study. Int J Impot Res, v. 19, n. 2, p. 200-7, Mar-Apr 2007.

- AYTA, I. A.; MCKINLAY, J. B.; KRANE, R. J. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int*, v. 84, n. 1, p. 50-6, Jul 1999.
- BARTON, M.; TRAUPE, T.; HAUDENSCHILD, C. C. Endothelin, hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Coron Artery Dis*, v. 14, n. 7, p. 477-90, Nov 2003.
- BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, v. 183, n. 2, p. 787-91, Jul 15 2009.
- BELLISAI, F. et al. Evaluation of the effect of Bosentan treatment on proinflammatory cytokine serum levels in patients affected by Systemic Sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 24, n. 1, p. 261-4, Jan-Mar 2011.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 4, n. 7, p. 517-29, Jul 2003.
- BIVALACQUA, T. J. et al. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 24, p. 9121-6, Jun 15 2004.
- BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S.; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 170, n. 2, p. 191-203, Oct 2003.
- BLANS, M. C. et al. Infection induced inflammation is associated with erectile dysfunction in men with diabetes. *Eur J Clin Invest*, v. 36, n. 7, p. 497-502, Jul 2006.
- BORMAN, M. A. et al. Smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase induces Ca²⁺ sensitization via myosin phosphatase inhibition. *J Biol Chem*, v. 277, n. 26, p. 23441-6, Jun 28 2002.
- BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, v. 405, n. 6785, p. 458-62, May 25 2000.
- BRACKETT, N. L. et al. Treatment of infertility in men with spinal cord injury. *Nat Rev Urol*, v. 7, n. 3, p. 162-72, Mar 2010.
- BROWATZKI, M. et al. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*, v. 95, n. 2, p. 98-105, Apr 2000.
- BROZ, P.; MONACK, D. M. Noncanonical inflammasomes: caspase-11 activation and effector mechanisms. *PLoS Pathog*, v. 9, n. 2, p. e1003144, Feb 2013.
- BLUTHE, R. M. et al. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III*, v. 317, n. 6, p. 499-503, Jun 1994.

- CALLERA, G. E. et al. ETA receptor mediates altered leukocyte-endothelial cell interaction and adhesion molecules expression in DOCA-salt rats. *Hypertension*, v. 43, n. 4, p. 872-9, Apr 2004.
- CARNEIRO, F. S. et al. DOCA-salt treatment enhances responses to endothelin-1 in murine corpus cavernosum. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 86, n. 6, p. 320-8, Jun 2008a.
- CARNEIRO, F. S. et al. Activation of the ET-1/ETA pathway contributes to erectile dysfunction associated with mineralocorticoid hypertension. *J Sex Med*, v. 5, n. 12, p. 2793-807, Dec 2008b.
- CARNEIRO, F. S. et al. TNF-alpha infusion impairs corpora cavernosa reactivity. *J Sex Med*, v. 6 Suppl 3, p. 311-9, Mar 2009.
- CHEN, Y. et al. Endothelin-1 receptor antagonists prevent the development of pulmonary emphysema in rats. *Eur Respir J*, v. 35, n. 4, p. 904-12, Apr 2010.
- CHESTER, A. H. et al. Influence of endothelin on human coronary arteries and localization of its binding sites. *Am J Cardiol*, v. 63, n. 18, p. 1395-8, Jun 1 1989.
- CHITALEY, K. et al. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nat Med*, v. 7, n. 1, p. 119-22, Jan 2001.
- CIRINO, G. et al. Pharmacology of erectile dysfunction in man. *Pharmacol Ther*, v. 111, n. 2, p. 400-23, Aug 2006.
- CLARKE, J. G. et al. Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men. *Am J Physiol*, v. 257, n. 6 Pt 2, p. H2033-5, Dec 1989.
- CLERK, A.; SUGDEN, P. H. Regulation of phospholipases C and D in rat ventricular myocytes: stimulation by endothelin-1, bradykinin and phenylephrine. *J Mol Cell Cardiol*, v. 29, n. 6, p. 1593-604, Jun 1997.
- COYLE, T. B.; METERSKY, M. L. The effect of the endothelin-1 receptor antagonist, bosentan, on patients with poorly controlled asthma: a 17-week, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study. *J Asthma*, v. 50, n. 4, p. 433-7, May 2013.
- CRUVINEL WDE, M. et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol*, v. 50, n. 4, p. 434-61, Jul-Aug 2010.
- CRUZ, C. M. et al. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*, v. 282, n. 5, p. 2871-9, Feb 2 2007.
- DAIL, W. G. et al. Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res*, v. 282, n. 1, p. 109-16, Oct 1995.

- DASHWOOD, M. R.; TSUI, J. C. Further evidence for a role of endothelin-1 (ET-1) in critical limb ischaemia. *J Cell Commun Signal*, v. 5, n. 1, p. 45-9, Mar 2011.
- DE GIUSTI, V. C. et al. The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species. *Life Sci*, v. 83, n. 7-8, p. 264-71, Aug 15 2008.
- DEAN, R. C.; LUE, T. F. Neuroregenerative strategies after radical prostatectomy. *Rev Urol*, v. 7 Suppl 2, p. S26-32, 2005.
- DI NUNZIO, A. S. et al. Endothelin-1 and -3 diminish neuronal NE release through an NO mechanism in rat anterior hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 283, n. 3, p. R615-22, Sep 2002.
- DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, v. 27, p. 519-50, 2009.
- DOI, T. et al. Aldosterone induces interleukin-18 through endothelin-1, angiotensin II, Rho/Rho-kinase, and PPARs in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 295, n. 3, p. H1279-H1287, Sep 2008.
- DONATE, P. B. et al. Bosentan, an endothelin receptor antagonist, ameliorates collagen-induced arthritis: the role of TNF-alpha in the induction of endothelin system genes. *Inflamm Res*, v. 61, n. 4, p. 337-48, Apr 2012.
- EARDLEY, I. e SETHIA, K. Erectile dysfunction : current investigation and management. London: Mosby 2nd ed.; 2003
- EMORI, T. et al. Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol*, v. 44, n. 12, p. 2409-11, Dec 15 1992.
- ESPOSITO, K. et al. Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. *JAMA*, v. 291, n. 24, p. 2978-84, Jun 23 2004.
- FABRICIO, A. S. et al. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. *Br J Pharmacol*, v. 125, n. 3, p. 542-8, Oct 1998.
- FABRICIO, A. S. et al. Interleukin-1 mediates endothelin-1-induced fever and prostaglandin production in the preoptic area of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 290, n. 6, p. R1515-23, Jun 2006.
- FELDMAN, H. A. et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*, v. 151, n. 1, p. 54-61, Jan 1994.
- FILIPPI, S. et al. Studies on the mechanisms involved in the ATP-induced relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. *J Urol*, v. 161, n. 1, p. 326-31, Jan 1999.

- FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res*, v. 43, n. 3, p. 532-41, Aug 15 1999.
- FOLDES, G. et al. Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells. *PLoS One*, v. 5, n. 5, p. e10501, 2010.
- FORD, R. L. et al. Endothelin-A receptor inhibition after cardiopulmonary bypass: cytokines and receptor activation. *Ann Thorac Surg*, v. 86, n. 5, p. 1576-83, Nov 2008.
- FRANCAVILLA, S. et al. Endothelin-1 in diabetic and nondiabetic men with erectile dysfunction. *J Urol*, v. 158, n. 5, p. 1770-4, Nov 1997.
- FRANCHI, L.; EIGENBROD, T.; NUNEZ, G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol*, v. 183, n. 2, p. 792-6, Jul 15 2009a.
- FRANCHI, L. et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*, v. 10, n. 3, p. 241-7, Mar 2009b.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980.
- GALLE, J. et al. CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O(2)(-) formation. *Nephrol Dial Transplant*, v. 15, n. 3, p. 339-46, Mar 2000.
- GANDAGLIA, G. et al. A systematic review of the association between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Eur Urol*, v. 65, n. 5, p. 968-78, May 2014.
- GONON, A. T. et al. Limitation of infarct size and attenuation of myeloperoxidase activity by an endothelin A receptor antagonist following ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*, v. 96, n. 5, p. 454-62, Sep 2001.
- GRANCHI, S. et al. Expression and regulation of endothelin-1 and its receptors in human penile smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod*, v. 8, n. 12, p. 1053-64, Dec 2002.
- GRATZKE, C. et al. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med*, v. 7, n. 1 Pt 2, p. 445-75, Jan 2010.
- GRIENDLING, K. K. et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, n. 10, p. 2175-83, Oct 2000.
- HANSEN, P. R. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, v. 91, n. 6, p. 1872-85, Mar 15 1995.

- HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, v. 6, n. 11, p. 1123-32, Nov 2005.
- HAUG, C. et al. Increased endothelin release by cultured human smooth muscle cells from atherosclerotic coronary arteries. *Cardiovasc Res*, v. 31, n. 5, p. 807-13, May 1996.
- HAYNES, W. G.; WEBB, D. J. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet*, v. 344, n. 8926, p. 852-4, Sep 24 1994.
- HAYNES, W. G.; WEBB, D. J. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens*, v. 16, n. 8, p. 1081-98, Aug 1998.
- HELSET, E. et al. Endothelin-1 stimulates human monocytes in vitro to release TNF-alpha, IL-1beta and IL-6. *Mediators Inflamm*, v. 2, n. 6, p. 417-22, 1993.
- HERRERA, M. et al. Endothelin-1 inhibits thick ascending limb transport via Akt-stimulated nitric oxide production. *J Biol Chem*, v. 284, n. 3, p. 1454-60, Jan 16 2009.
- HICKEY, K. A. et al. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol*, v. 248, n. 5 Pt 1, p. C550-6, May 1985.
- HIRATA, K. et al. Effect of sildenafil on cardiac performance in patients with heart failure. *Am J Cardiol*, v. 96, n. 10, p. 1436-40, Nov 15 2005.
- HOFFMAN, H. M.; BRYDGES, S. D. Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease. *J Biol Chem*, v. 286, n. 13, p. 10889-96, Apr 1 2011.
- HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, v. 9, n. 8, p. 847-56, Aug 2008.
- HORVATH, G. L. et al. Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes. *Immunol Rev*, v. 243, n. 1, p. 119-35, Sep 2011.
- HOTSTON, M. R. et al. Sildenafil inhibits the up-regulation of phosphodiesterase type 5 elicited with nicotine and tumour necrosis factor-alpha in cavernosal vascular smooth muscle cells: mediation by superoxide. *BJU Int*, v. 99, n. 3, p. 612-8, Mar 2007.
- HSU, L. C. et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 22, p. 7803-8, Jun 3 2008.
- HUGHES, A. K. et al. Effect of reactive oxygen species on endothelin-1 production by human mesangial cells. *Kidney Int*, v. 49, n. 1, p. 181-9, Jan 1996.
- IKEDA, U. et al. Mitogenic action of interleukin-1 alpha on vascular smooth muscle cells mediated by PDGF. *Atherosclerosis*, v. 84, n. 2-3, p. 183-8, Oct 1990.

- INOHARA, N. et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*, v. 274, n. 21, p. 14560-7, May 21 1999.
- INOUE, A. et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, n. 8, p. 2863-7, Apr 1989.
- JAUREGUIBERRY, M. S. et al. Endothelin 1 and 3 enhance neuronal nitric oxide synthase activity through ETB receptors involving multiple signaling pathways in the rat anterior hypothalamus. *Peptides*, v. 25, n. 7, p. 1133-8, Jul 2004.
- JIN, C.; FLAVELL, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol*, v. 30, n. 5, p. 628-31, Sep 2010.
- KAMATA, K. et al. Endothelin-1-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in aortas isolated from controls and diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 44 Suppl 1, p. S186-90, Nov 2004.
- KANG, S. J. et al. Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *J Cell Biol*, v. 149, n. 3, p. 613-22, May 1 2000.
- KAWAGUCHI, M. et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, v. 123, n. 6, p. 594-604, Feb 15 2011.
- KARAM, H. et al. Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. Comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism. *Hypertension*, v. 28, n. 3, p. 379-85, Sep 1996.
- KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, v. 479, n. 7371, p. 117-21, Nov 3 2011.
- KEDZIERSKI, R. M.; YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 41, p. 851-76, 2001.
- KENDIRCI, M. et al. Peripheral mechanisms of erectile dysfunction in a rat model of chronic cocaine use. *Eur Urol*, v. 52, n. 2, p. 555-63, Aug 2007.
- KIM, D. C.; GONDRE, C. M.; CHRIST, G. J. Endothelin-1-induced modulation of contractile responses elicited by an alpha 1-adrenergic agonist on human corpus cavernosum smooth muscle. *Int J Impot Res*, v. 8, n. 1, p. 17-24, Mar 1996.
- KIRBY, M. et al. Is erectile dysfunction a marker for cardiovascular disease? *Int J Clin Pract*, v. 55, n. 9, p. 614-8, Nov 2001.
- KLENIEWSKA, P. et al. Influence of block of NF-kappa B signaling pathway on oxidative stress in the liver homogenates. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2013, p. 308358, 2013.

- KOHAN, D. E. The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 15, n. 1, p. 34-40, Jan 2006.
- KOHAN, D. E.; BARTON, M. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Int*, v. 86, n. 5, p. 896-904, Nov 2014.
- KOMADA, T. et al. ASC in renal collecting duct epithelial cells contributes to inflammation and injury after unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol*, v. 184, n. 5, p. 1287-98, May 2014.
- KOWALCZYK, A. et al. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, v. 63, n. 1, p. 41-52, Feb 2015.
- KRISHNAN, S. M. et al. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *Br J Pharmacol*, Jun 23 2015.
- KUIDA, K. et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, v. 267, n. 5206, p. 2000-3, Mar 31 1995.
- KUMAR, J. et al. Erectile dysfunction precedes and is associated with severity of coronary artery disease among Asian Indians. *J Sex Med*, v. 10, n. 5, p. 1372-9, May 2013.
- LEE, G. S. et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. *Nature*, v. 492, n. 7427, p. 123-7, Dec 6 2012.
- LEITE, R. et al. Targets for the treatment of erectile dysfunction: is NO/cGMP still the answer? *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, v. 2, n. 2, p. 119-32, Jun 2007.
- LEITE, L. N. et al. Ethanol consumption increases endothelin-1 expression and reactivity in the rat cavernosal smooth muscle. *Alcohol Alcohol*, v. 48, n. 6, p. 657-66, Nov-Dec 2013.
- LI, L. et al. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*, v. 42, n. 3, p. 316-21, Sep 2003a.
- LI, L. et al. Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*, v. 42, n. 5, p. 997-1003, Nov 2003b.
- LIANG, L. et al. Endothelin-1 stimulates proinflammatory cytokine expression in human periodontal ligament cells via mitogen-activated protein kinase pathway. *J Periodontol*, v. 85, n. 4, p. 618-26, Apr 2014.
- LIN, C. C. et al. Endothelin-1 induces VCAM-1 expression-mediated inflammation via receptor tyrosine kinases and Elk/p300 in human tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 309, n. 3, p. L211-25, Aug 1 2015.
- LUE, T. F. Erectile dysfunction. *N Engl J Med*, v. 342, n. 24, p. 1802-13, Jun 15 2000.

- LUSCHER, T. F.; BARTON, M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*, v. 102, n. 19, p. 2434-40, Nov 7 2000.
- MACARTHUR, H. et al. Endothelin-1 release from endothelial cells in culture is elevated both acutely and chronically by short periods of mechanical stretch. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 200, n. 1, p. 395-400, Apr 15 1994.
- MAEKAWA, M. et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, v. 285, n. 5429, p. 895-8, Aug 6 1999.
- MALEK, A. M. et al. Endothelin-1 gene suppression by shear stress: pharmacological evaluation of the role of tyrosine kinase, intracellular calcium, cytoskeleton, and mechanosensitive channels. *J Mol Cell Cardiol*, v. 31, n. 2, p. 387-99, Feb 1999.
- MANN, D. L. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ Res*, v. 108, n. 9, p. 1133-45, Apr 29 2011.
- MARIATHASAN, S. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect*, v. 9, n. 5, p. 664-71, Apr 2007.
- MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2007.
- MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-32, Mar 9 2006.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, v. 27, p. 229-65, 2009.
- MASAKI, T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci*, v. 25, n. 4, p. 219-24, Apr 2004.
- MCFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol*, v. 135, n. 1, p. 1-13, Jan 2002.
- MENU, P. et al. Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell Death Dis*, v. 2, p. e137, 2011.
- MOHAZZAB, K. M.; KAMINSKI, P. M.; WOLIN, M. S. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*, v. 266, n. 6 Pt 2, p. H2568-72, Jun 1994.
- MORANO, S. et al. Antioxidant treatment associated with sildenafil reduces monocyte activation and markers of endothelial damage in patients with diabetic erectile dysfunction: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur Urol*, v. 52, n. 6, p. 1768-74, Dec 2007.

- MORELAND, R. B. et al. The biochemical and neurologic basis for the treatment of male erectile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 296, n. 2, p. 225-34, Feb 2001.
- MUMTAZ, F. H. et al. Pharmacological properties of endothelin-1 in the rabbit corpus cavernosum. *In Vivo*, v. 20, n. 2, p. 243-6, Mar-Apr 2006.
- MUNIZ, J. J. et al. Chronic ethanol consumption induces erectile dysfunction: Role of oxidative stress. *Life Sci*, Sep 23 2015.
- MURANYI, A. et al. Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J*, v. 366, n. Pt 1, p. 211-6, Aug 15 2002.
- NAKA, T. et al. Mechanical stretch induced interleukin-18 (IL-18) expression through Angiotensin subtype 1 receptor (AT1R) and endothelin-1 in cardiomyocytes. *Prep Biochem Biotechnol*, v. 38, n. 2, p. 201-12, 2008.
- NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*, v. 19, p. 423-74, 2001.
- NEHRA, A. et al. Diagnosis and treatment of erectile dysfunction for reduction of cardiovascular risk. *J Urol*, v. 189, n. 6, p. 2031-8, Jun 2013.
- NELSON, J. et al. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 3, n. 2, p. 110-6, Feb 2003.
- NOMOTO, A. et al. Smooth muscle cell migration induced by inflammatory cell products and its inhibition by a potent calcium antagonist, nilvadipine. *Atherosclerosis*, v. 72, n. 2-3, p. 213-9, Aug 1988.
- OKTAR, B. K. et al. Endothelin-1-induced PMN infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 279, n. 3, p. G483-91, Sep 2000.
- ORTMANN, J. et al. Endothelin inhibition delays onset of hyperglycemia and associated vascular injury in type I diabetes: evidence for endothelin release by pancreatic islet beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 334, n. 2, p. 689-95, Aug 26 2005.
- PARISSIS, J. T. et al. Plasma profiles of peripheral monocyte-related inflammatory markers in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. *Int J Cardiol*, v. 83, n. 1, p. 13-21, Apr 2002.
- OZDEMIR, R. et al. Selective endothelin a (ETA) receptor antagonist (BQ-123) reduces both myocardial infarct size and oxidant injury. *Toxicology*, v. 219, n. 1-3, p. 142-9, Feb 15 2006.
- PARKKISENNIEMI, U. M.; KLINGE, E. Functional characterization of endothelin receptors in the bovine retractor penis muscle and penile artery. *Pharmacol Toxicol*, v. 79, n. 2, p. 73-9, Aug 1996.

- PEDRA, J. H.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol*, v. 21, n. 1, p. 10-6, Feb 2009.
- PETRILLI, V. et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*, v. 14, n. 9, p. 1583-9, Sep 2007.
- PIECHOTA, A.; GORACA, A. Influence of nuclear factor-kappaB inhibition on endothelin-1 induced lung edema and oxidative stress in rats. *J Physiol Pharmacol*, v. 62, n. 2, p. 183-8, Apr 2011.
- PIECHOTA-POLANCZYK, A.; KLENIEWSKA, P.; GORACA, A. The influence of ETA and ETB receptor blockers on LPS-induced oxidative stress and NF-kappaB signaling pathway in heart. *Gen Physiol Biophys*, v. 31, n. 3, p. 271-8, Sep 2012.
- PRIETO, D. et al. Interactions between neuropeptide Y and the adenylate cyclase pathway in rat mesenteric small arteries: role of membrane potential. *J Physiol*, v. 502 (Pt 2), p. 281-92, Jul 15 1997.
- PRIETO, D. et al. Neuropeptide Y regulates intracellular calcium through different signalling pathways linked to a Y(1)-receptor in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol*, v. 129, n. 8, p. 1689-99, Apr 2000.
- PRIETO, D. et al. Ca²⁺-activated K⁺ (KCa) channels are involved in the relaxations elicited by sildenafil in penile resistance arteries. *Eur J Pharmacol*, v. 531, n. 1-3, p. 232-7, Feb 15 2006.
- PRINS, B. A. et al. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, v. 269, n. 16, p. 11938-44, Apr 22 1994.
- PRIVIERO, F. B. et al. Neurophysiological basis of penile erection. *Acta Pharmacol Sin*, v. 28, n. 6, p. 751-5, Jun 2007.
- RATHINAM, V. A.; VANAJA, S. K.; FITZGERALD, K. A. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*, v. 13, n. 4, p. 333-42, Apr 2012.
- REDMOND, E. M. et al. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, v. 166, n. 3, p. 469-79, Mar 1996.
- RENDELL, M. S. et al. Sildenafil for treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a randomized controlled trial. Sildenafil Diabetes Study Group. *JAMA*, v. 281, n. 5, p. 421-6, Feb 3 1999.
- RITCHIE, R.; SULLIVAN, M. Endothelins & erectile dysfunction. **Pharmacol Res**, v. 63, n. 6, p. 496-501, Jun 2011.
- RODRIGUES, F. L. et al. There is a link between erectile dysfunction and heart failure: it could be inflammation. *Curr Drug Targets*, v. 16, n. 5, p. 442-50, 2015.

- RUSSELL, F. D.; DAVENPORT, A. P. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol*, v. 126, n. 2, p. 391-8, Jan 1999.
- SAENZ DE TEJADA, I. et al. Physiology of erectile function. *J Sex Med*, v. 1, n. 3, p. 254-65, Nov 2004.
- SALEH, M. A.; POLLOCK, D. M. Endothelin in renal inflammation and hypertension. *Contrib Nephrol*, v. 172, p. 160-70, 2011.
- SANCHEZ, A. et al. Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin-resistant obese rats: role of ET(A) and ET(B) receptors. *Br J Pharmacol*, v. 171, n. 24, p. 5682-95, Dec 2014.
- SCHLOSSMANN, J.; FEIL, R.; HOFMANN, F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*, v. 35, n. 1, p. 21-7, 2003.
- SCHULTZ, K. et al. Endogenous interleukin-1 alpha promotes a proliferative and proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 292, n. 6, p. H2927-34, Jun 2007.
- SEFTEL, A. D. Phosphodiesterase type 5 inhibitors: molecular pharmacology and interactions with other phosphodiesterases. *Curr Pharm Des*, v. 11, n. 31, p. 4047-58, 2005.
- SHABSIGH, R. et al. Drivers and barriers to seeking treatment for erectile dysfunction: a comparison of six countries. *BJU Int*, v. 94, n. 7, p. 1055-65, Nov 2004.
- SHABSIGH, R. et al. Health issues of men: prevalence and correlates of erectile dysfunction. *J Urol*, v. 174, n. 2, p. 662-7, Aug 2005.
- SHAO, W. et al. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J Biol Chem*, v. 282, n. 50, p. 36321-9, Dec 14 2007.
- SIMONSEN, U.; GARCIA-SACRISTAN, A.; PRIETO, D. Penile arteries and erection. *J Vasc Res*, v. 39, n. 4, p. 283-303, Jul-Aug 2002.
- SIMONSON, M. S.; DUNN, M. J. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J*, v. 4, n. 12, p. 2989-3000, Sep 1990.
- SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*, v. 10, n. 2, p. 89-102, Feb 2010.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, v. 522 Pt 2, p. 177-85, Jan 15 2000.

- SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*, v. 78, n. 6, p. 539-52, Sep 15 2009. 0006-2952
- STALLMANN-JORGENSEN, I. et al. A Toll-Like Receptor 1/2 Agonist Augments Contractility in Rat Corpus Cavernosum. *J Sex Med*, v. 12, n. 8, p. 1722-31, Aug 2015.
- STEINMAN, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol*, v. 5, n. 6, p. 575-81, Jun 2004.
- SUZUKI, S. et al. Endothelin-1-induced prostaglandin E2 production: modulation of contractile response to endothelin-1 in porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol*, v. 217, n. 1,
- TABUCHI, Y. et al. Endothelin enhances adrenergic vasoconstriction in perfused rat mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 159, n. 3, p. 1304-8, Mar 31 1989.
- TANGI, T. N. et al. Role of NLRP3 and CARD8 in the regulation of TNF-alpha induced IL-1beta release in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med*, v. 30, n. 3, p. 697-702, Sep 2012.
- TSAI, B. M. et al. Differential effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery cytokine expression. *Ann Thorac Surg*, v. 81, n. 1, p. 272-8, Jan 2006.
- TONARI, M. et al. Blocking endothelin-B receptors rescues retinal ganglion cells from optic nerve injury through suppression of neuroinflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 53, n. 7, p. 3490-500, Jun 2012.
- TOUSOULIS, D. et al. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*, v. 201, n. 2, p. 236-47, Dec 2008.
- TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, v. 7, n. 3, p. 179-90, Mar 2007.
- TYKOCKI, N. R.; WATTS, S. W. The interdependence of endothelin-1 and calcium: a review. *Clin Sci (Lond)*, v. 119, n. 9, p. 361-72, Nov 2010.
- VLACHOPOULOS, C.; HIRATA, K.; O'ROURKE, M. F. Effect of sildenafil on arterial stiffness and wave reflection. *Vasc Med*, v. 8, n. 4, p. 243-8, Nov 2003.
- VLACHOPOULOS, C. et al. Type 5 phosphodiesterase inhibition by sildenafil abrogates acute smoking-induced endothelial dysfunction. *Am J Hypertens*, v. 17, n. 11 Pt 1, p. 1040-4, Nov 2004.
- VAN MOURIK, J. A.; ROMANI DE WIT, T.; VOORBERG, J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol*, v. 117, n. 2, p. 113-22, Feb 2002.

- VILAYSANE, A. et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol*, v. 21, n. 10, p. 1732-44, Oct 2010.
- VIRDIS, A.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 12, n. 2, p. 181-7, Mar 2003.
- WAGNER, O. F. et al. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, v. 267, n. 23, p. 16066-8, Aug 15 1992.
- WATKINS, L. R. et al. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett*, v. 183, n. 1-2, p. 27-31, Jan 2 1995.
- WENG, C. M. et al. The endothelin A receptor mediates fibrocyte differentiation in chronic obstructive asthma. The involvement of connective tissue growth factor. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 188, n. 3, p. 298-308, Aug 1 2013.
- WEDGWOOD, S.; DETTMAN, R. W.; BLACK, S. M. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 281, n. 5, p. L1058-67, Nov 2001.
- WINGARD, C. J. et al. RhoA-Rho kinase mediates synergistic ET-1 and phenylephrine contraction of rat corpus cavernosum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 285, n. 5, p. R1145-52, Nov 2003.
- 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.
- YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci*, v. 10, n. 9, p. 374-8, Sep 1989.
- YANG, Z. H. et al. Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. A new mechanism of vasospasm? *Circulation*, v. 82, n. 1, p. 188-95, Jul 1990.
- YEAGER, M. E. et al. Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: role of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 46, n. 1, p. 14-22, Jan 2012.
- YIN, Y. et al. Inflammasomes: sensors of metabolic stresses for vascular inflammation. *Front Biosci (Landmark Ed)*, v. 18, p. 638-49, 2013.
- YOSHITOMI, Y. et al. Acute renal failure in accidental hypothermia of cold water immersion. *Am J Kidney Dis*, v. 31, n. 5, p. 856-9, May 1998.
- ZENG, Q. et al. Endothelin-1 regulates cardiac L-type calcium channels via NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 326, n. 3, p. 732-8, Sep 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 005/2015-1, sobre o projeto intitulado “*Papel da endotelina-1 na ativação do NLRP3 no tecido muscular liso do corpo cavernoso*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Fernando Silva Carneiro** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de maio de 2015.

We certify that the protocol nº 005/2015-1, entitled “*Endothelin-1's role in NLRP3 activation in smooth muscle of the corpus cavernosum*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/25/2015.

Ribeirão Preto, 25 de maio de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP - USP