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

ALINE GARCIA FEDOCE

**CONTRIBUIÇÃO DO IL-1RI NA DISFUNÇÃO E REMODELAMENTO VASCULAR
NA HIPERTENSÃO POR ANGIOTENSINA II**

RIBEIRÃO PRETO-SP

2019

ALINE GARCIA FEDOCE

**CONTRIBUIÇÃO DO IL-1RI NA
DISFUNÇÃO E REMODELAMENTO
VASCULAR NA HIPERTENSÃO
POR ANGII**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro

RIBEIRÃO PRETO-SP

2019

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.

Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP
Universidade de São Paulo
Ficha Catalográfica

Fedoce, Garcia Aline

Contribuição do IL1-RI na disfunção e remodelamento vascular na hipertensão por ANGII. Ribeirão Preto, 2019. p.79, 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo – Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Carneiro, Fernando Silva

1. Hipertensão arterial 2.IL-1RI 3.IL-1 β 3. Disfunção endotelial 4. Remodelamento vascular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Aline Garcia Fedoce

Título: CONTRIBUIÇÃO DO IL-1RI NA DISFUNÇÃO E REMODELAMENTO VASCULAR NA HIPERTENSÃO POR ANGII

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

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

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

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

Dedicatória

À Deus por nos guiar nos momentos difíceis e por continuar a
nos abençoar nos momentos de felicidade

À minha mãe Ivanete Garcia e em memória do meu pai Devair Fedoce.

Obrigado por tudo!

Agradecimentos

Ao longo da execução deste trabalho, muitas pessoas contribuíram para os resultados obtidos e crescimento pessoal e profissional obtido.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Fernando Carneiro, por sempre acreditar na minha capacidade, e ter me orientado durante esta trajetória.

A Prof.^a Rita Tostes, que sempre me auxiliou nas questões científicas e foi essencial para a execução deste trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus companheiros de laboratório, Emiliana, Sara, Josiane, Allan, Juliano, Julio, Daniel, Tiago, Diane, Alecsander, Rafael Fais, Rafael Menezes, Nathanne, Camila Zanotto. E em especial a Camila André, por me auxiliar tecnicamente e cientificamente. A todos vocês, meu muito obrigada pela ajuda e por compartilhar um ambiente de trabalho de alegria e harmonia.

Às técnicas de laboratório Carla Pavan, Fabíola Mestriner e Giuliana por tornar possível a pelo auxílio prestado e por aprimorarem a organização do laboratório.

Aos demais técnicos do departamento de farmacologia, no qual tornaram possível a execução de técnicas deste trabalho, Beto, Prof. Rúbens Fazan, Eliana, Prof.^a Michele Castro. Além dos que contribuem para o cuidado dos animais Orlando, Marcos e Adriana.

A secretária Gislaíne, e ao Ramon que sempre me auxiliaram nas questões burocráticas.

Aos alunos do departamento e professores que colaboraram para a execução de diversas técnicas, Vanessa Borges, Prof. Fernando Cunha, Juliana, Prof.^a Michele Castro, Natália, Prof. Carlos Tirapelli, e a Prof.^a Fernanda Amaral.

A todos os meus amigos do departamento de farmacologia, que sempre me motivaram a seguir em frente e buscar o melhor de mim, Juliano, Wanessa, Jéssica, Flávio, Alice, Nicole, Atlante, Allan, Ivaldo, Franciele, Melissa, Jeimison, e tantos outros que estiveram sempre com um café e um abraço para me confortar.

A minha família por prestar um suporte incondicional nas decisões que tomei até aqui, e pelas decisões futuras, Ivanete minha querida mãe, e ao meu irmão João Pedro.

A todos que de alguma forma contribuíram cientificamente e/ou emocionalmente durante esses dois anos, meu muito obrigada.

As agências de fomento CNPQ e CAPES.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”*
(Arthur Schopenhauer)

Resumo

FEDOCE, A.G. 2019.79 p. Contribuição do IL1-RI na disfunção e remodelamento vascular na hipertensão por angiotensina II. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

As concentrações circulantes e vasculares da interleucina (IL)-1 β estão elevadas na hipertensão arterial (HA), e polimorfismos no receptor de interleucinas do tipo I (IL-1RI) estão associados a essa doença. A IL-1 β promove ações diretas na vasculatura: disfunção endotelial em artérias mesentéricas de resistência (AMR), aumento da migração e proliferação de células musculares lisas vasculares, além da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O papel exercido pelo IL-1RI no contexto da HA carece de elucidacões. O presente trabalho testou a hipótese de que o IL-1RI promove disfunção endotelial e remodelamento vascular em decorrência da geração de EROs na hipertensão induzida por angiotensina II (ANGII). Este estudo avaliou se a ausência do IL-1RI seria capaz de prevenir o aumento da pressão arterial induzida por ANGII, disfunção endotelial, remodelamento vascular, geração de EROs e hipertrofia cardíaca. Nosso estudo demonstrou que a deleção do IL1-RI não foi capaz de prevenir o aumento da PA em camundongos nocautes submetidos a HA por ANGII. As concentrações circulantes de IL-1 β estavam elevadas em animais hipertensos, sugerindo a contribuição desta citocina na cascata de sinalização mediada via IL1-RI. A ausência do IL-1RI foi capaz de prevenir a disfunção endotelial e diminuir o remodelamento vascular em AMR. O estresse oxidativo foi significativamente menor em animais nocautes para IL1-RI infundidos com ANGII. Em suma, os resultados encontrados indicam que o IL-1RI promove disfunção endotelial e remodelamento vascular em AMR na HA induzida por ANGII. Ademais, o aumento da geração de EROs é um mecanismo potencial nas mudanças funcionais e estruturais promovidas via IL-1RI na HA induzida por infusão de ANGII.

Palavras chave: Hipertensão arterial, IL-1 β , IL-1RI, disfunção endotelial, remodelamento vascular, artérias mesentéricas de resistência.

Abstract

FEDOCE, A.G., 2019. 79 p. IL-1-RI contribution to vascular dysfunction and remodeling in angiotensin II-induced hypertension. Dissertation (Master in Pharmacology) –Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2019.

Circulating and vascular wall concentrations of interleukin (IL)-1 β are elevated in arterial hypertension (AH), and polymorphisms in the interleukin type I receptor (IL-1RI) are associated with this disease. IL-1 β promotes direct actions in the vasculature: endothelial dysfunction in mesenteric arteries of resistance (AMR), increased migration and proliferation of vascular smooth muscle cells, and the production of reactive oxygen species (ROS). The role played by IL-1RI in the context of HA needs elucidation. O papel exercido pelo IL-1RI no contexto da HA carece de elucidações. The present study tested the hypothesis that IL-1RI promotes endothelial dysfunction and vascular remodeling due to the generation of ROS in angiotensin II (ANGII)-induced hypertension. This study determined whether the absence of IL-1RI would be able to prevent the increase of blood pressure (BP), endothelial dysfunction, vascular remodeling, ROS generation, and cardiac hypertrophy in ANGIO-induced hypertensive mice. Our study demonstrated that IL1-RI deletion was not able to prevent the increase of PA in knockout mice subjected to HA by ANGIO. Circulating concentrations of IL-1 β were elevated in hypertensive animals, suggesting the contribution of this cytokine in the signaling cascade mediated via IL1-RI. The absence of IL-1RI was able to prevent endothelial dysfunction and decrease vascular remodeling in MRA. The oxidative stress was significantly lower in IL1-RI knockout animals infused with ANGIO. In summary, the results indicate that IL-1RI promotes endothelial dysfunction and vascular remodeling in MRA in AH induced by ANGIO. In addition, increased ROS generation is a potential mechanism in the functional and structural changes promoted via IL-1RI in AH by ANGIO infusion.

Key words:

Arterial Hypertension, IL-1 β , IL-1RI, endothelial dysfunction, vascular remodeling, mesenteric resistance arteries

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ACh	acetilcolina
AMR	artéria mesentérica de resistência
ANGII	angiotensina II
ANOVA	análise de variância
AR	artéria de resistência
ASC	proteína partícula-símile associada à apoptose
AST	área de secção transversal
ATP	trifosfato de adenosina
AT1	receptor de angiotensina II do tipo 1
AUC	área sob a curva
BH4	tetraidrobiopterina
Ca ²⁺	cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CARD	domínio N-terminal de recrutamento de caspase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMLV	células de músculo liso vascular
CO ₂	dióxido de carbono
CONCEA	conselho nacional de controle de experimentação animal
COX	ciclooxigenase
DAMPs	padrões moleculares associados ao dano tecidual
DE	disfunção endotelial
De	diâmetro externo
Di	diâmetro interno
DNAm	DNA mitocondrial
DOCA-sal	acetato de desoxicorticosterona e cloreto de sódio
DSS	Dahl sensíveis ao sal
E.P.M.	erro padrão da média
EC ₅₀	concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo
EDCF	fatores contráteis derivados do endotélio
EDHF	fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
EDRFs	fator relaxante derivado do endotélio (<i>endothelium-derived relaxing factor</i>)
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
EGTA	ácido tetra acético etileno glicol
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática

Em _{ax}	resposta máxima
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	espécies reativas de oxigênio
ET-1	endotelina-1
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FC	frequência cardíaca
Fe	fenilefrina
H ₂ O	água
HA	hipertensão arterial
IL-1	interleucina 1
IL-10	interleucina 10
IL-17	interleucina 17
IL-18	interleucina 18
IL-1Ra	antagonista do receptor de interleucina 1
IL-1RacP	proteína acessória do receptor de IL-1RI
IL-1RI	receptor de interleucina 1
IL-1RII	receptor de interleucina 1 do tipo II
IL-1 α	interleucina alfa
IL-1 β	interleucina-1 beta
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IRAK 1	proteínas quinases ativadas pelo receptor de interleucina-1 do tipo 1
IRAK 2	proteínas quinases ativadas pelo receptor de interleucina-1 do tipo 2
IRAK 4	proteínas quinases ativadas pelo receptor de interleucina-1 do tipo 4
JNK	c-Jun quinase N-terminal
K ⁺	potássio
Kg	quilo
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato monobásico de potássio
kPa	quilopascal
L-NAME	L-arginina metil éster
LPS	lipopolissacarídeo
LRR	região C-terminal de repetições ricas em leucina
M	molar
M/L	razão média/lúmen

MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos
MMP	metaloproteinases de matrix
MMP-2	metaloproteinases de matrix do tipo 2
MMP-9	metaloproteinases de matrix do tipo 9
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mmHg	milímetros de mercúrio
mN	milinewton
Mn-SOD	manganês superóxido dismutase
NaCl	cloreto de sódio
NACHT	domínio central comum presente em NAIP, CIITA, HET-E e TP-1.
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD(P)H	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio monobásico
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NF-κB	fator nuclear kappa B
NLR	receptores do tipo NOD
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
NOX1	NAD(P)H oxidase 1
NOX2	NAD(P)H oxidase 2
NOX4	NAD(P)H oxidase 4
NOX5	NAD(P)H oxidase 5
NPS	nitroprussiato de sódio
O ₂	oxigênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PAM	pressão arterial média
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PAS	pressão arterial sistólica

pEC_{50}	logaritmo negativo da concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo
ONOO-	peroxinitrito
PYD	domínio de pirina N-terminal
RVP	resistência vascular periférica
SIGIRR	<i>single Ig IL-1-related receptor</i>
sIL-1RII	receptor de interleucina 1 do tipo II solúvel
sIL-1RacP	proteína acessória solúvel do receptor de IL-1RI
SOD	superóxido dismutase
SRA	sistema renina-angiotensina
SKH	solução Krebs-Henseleit
Th1	linfócitos T auxiliares 1
TIR	domínio do receptor Toll/Interleucina-1
Tiron	4,5-dihidroxi-ácido 1,3-benzenodissulfônico dissódico monohidratado
TLR-4	receptor do tipo Toll 4
TLRs	receptores do tipo Toll
TMB	tetrametilbenzidina
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	fator associado ao fator de necrose tumoral do tipo 6
USP	Universidade de São Paulo
URL	unidade relativa de luminescência
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular-1
WT	tipo selvagem
μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
μmol	micromol
2R-1C	2 rins um clipe

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3 e liberação das interleucinas IL-1 β e IL-18.....	31
Figura 2. Representação das ações da IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra nos seus respectivos receptores.....	36
Figura 3. Esquema representativo da hipótese do trabalho.....	39
Figura 4. Pressão arterial e frequência cardíaca.....	49
Figura 5. O nocaute para IL-1RI previne a disfunção endotelial.....	51
Figura 6. A ausência de IL-1RI apresenta menor remodelamento vascular.....	54
Figura 7. Animais com IL-1RI ausente apresentam menores concentrações de IL-1 β sérica.....	55
Figura 8. A deleção do IL-1RI apresenta menor geração de espécies reativas de oxigênio.....	56
Figura 9. A hipertrofia cardiovascular é prevenida em animais nocautes para IL-1RI.....	58
Figura 10. Esquema representativo da conclusão do presente estudo.....	66

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores de Emax e pEC50 das curvas concentração-efeito para o agonista contrátil Fe e para agonistas vasodilatadores ACh e NPS em AMR dos animais WT e IL-1RI ^{-/-} SHAM ou infundidos com ANGII.....	52

1- Introdução	25
1.1 Hipertensão arterial e artérias de resistência.....	25
1.2 Hipertensão arterial e remodelamento vascular em artérias de resistência.....	26
1.3 Disfunção endotelial e estresse oxidativo via NAD(P)H oxidases na hipertensão arterial.....	27
1.4 Ativação do inflamassoma NLRP3 e liberação de IL-1 β na hipertensão arterial.....	29
1.5 Sistema Renina-Angiotensina e IL-1 β na hipertensão arterial.....	34
1.6 Interleucinas do tipo 1 e seus respectivos receptores na hipertensão arterial.....	33
2- JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	39
3- OBJETIVO GERAL	41
3.1 Objetivo específico.....	41
4- MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Animais	43
4.2 Indução da hipertensão arterial	43
4.3 Avaliação da pressão arterial	43
4.4 Avaliação da função vascular	44
4.5 Análise mecânica arterial.....	45
4.6 Análise estrutural das artérias mesentéricas de resistência.....	46
4.7 Dosagem sérica de IL-1 β	46
4.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio.....	46
4.9 Análise histológica do coração.....	46
4.10 Análise estatística	47
5-RESULTADOS	48
5.1 Análise da pressão arterial e frequência cardíaca.....	48
5.2 Avaliação da função vascular contrátil e vasodilatadora dependente e independente de endotélio.....	50
5.3 Análise estrutural e mecânica das artérias mesentéricas de resistência.....	53
5.4 Avaliação das concentrações séricas de IL-1 β	55
5.5 Detecção de espécies reativas de oxigênio.....	56
5.6 Avaliação de hipertrofia dos cardiomiócitos.....	57
6-DISSCUSSÃO.....	60

7-CONCLUSÃO	66
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
9-ANEXOS	79

Introdução

---

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial e artérias de resistência

A hipertensão arterial (HA) é considerada um grave problema de saúde pública no mundo, e afeta mais de 1,39 bilhão de pessoas, sendo a principal causa de morte prematura evitável e o principal risco para morbidade e mortalidade cardiovascular e renal (MILLS *et al.*, 2016; BLOCH, *et al.*, 2016). Durante anos a HA foi classificada com a pressão arterial (PA) acima de 140/90mmHg (sistólica/diastólica), mas recentemente novas diretrizes da *American Heart Association* apontam 4 categorias a seguir:

- I. Normal- $PA \leq 120/80\text{mmHg}$
- II. Elevada- $PA \leq 120-129/80\text{mmHg}$
- III. Hipertensão de estágio I- $PA \geq 130-139/80-89\text{mmHg}$
- IV. Hipertensão de estágio II- $PA \geq 140/90\text{mmHg}$

A HA essencial ou primária, quando a causa não é identificável, corresponde a 90% dos casos. Ao passo que, a HA secundária, quando a causa é identificável, corresponde aos outros 10% restantes dos casos. Embora a maioria das orientações sejam direcionadas a mudanças no estilo de vida e medicamentos anti-hipertensivos clássicos, uma pequena parcela dos pacientes com HA é resistente aos tratamentos convencionais. Desta forma, novos alvos terapêuticos para o tratamento da HA tornam-se imprescindíveis (YAXLEY *et al.*, 2015; WHELTON *et al.*, 2017).

De fato, um marcador primordial da HA é o aumento sustentado da resistência vascular periférica (RVP) (LUND-JOHANSEN, 1983). As artérias de resistência (AR) possuem lúmen $\leq 300\mu\text{m}$, e são essenciais para controlar as alterações da PA. O aumento da vasoconstrição dessas artérias na HA resulta em aumento da resistência vascular periférica (RVP) pela redução do diâmetro do lúmen vascular (SCHIFFRIN, 1992).

Ao comparar AR com artérias de maior calibre (condutância), as AR possuem maior quantidade de células musculares lisas vasculares (CMLV) e quantidade escassa de elastina. Essas características estruturais das AR contribuem para maior contratilidade e resistência ao fluxo sanguíneo exercido na parede do vaso. Em contrapartida, as artérias de condutância possuem uma camada média com maior quantidade de elastina que CMLV, facilitando a complacência vascular e garantindo menor impedância em resposta as elevadas pressões do fluxo sanguíneo (BROWN *et al.*, 2018).

De acordo com a lei de Poiseuille, a resistência ao fluxo é inversamente proporcional ao raio do vaso elevado à quarta potência. Sendo assim, ao diminuir o lúmen de artérias de pequeno calibre a resistência exercida será maior, resultando em um aumento da RVP. Desta forma, as AR desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão da HA. No qual alterações funcionais como a disfunção endotelial (DE), e alterações estruturais como o remodelamento vascular, resultam em alterações mecânicas vasculares, e progridem para complicações cardiovasculares e lesões em órgãos-alvo (SCHIFFRIN, 1992; 2004).

1.2 Hipertensão arterial e remodelamento vascular em artérias de resistência

Na HA, o remodelamento vascular é um processo crônico adaptativo com alterações estruturais nos vasos sanguíneos, que contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença (RENNA *et al.*, 2013). O remodelamento das AR é uma das primeiras manifestações das lesões de órgãos-alvo na hipertensão, seguido de DE e hipertrofia cardíaca (PARK *et al.*, 2001). Os processos desencadeantes do remodelamento arterial na HA incluem crescimento e migração celular, síntese ou degradação da matriz extracelular, apoptose, inflamação e fibrose. (RENNA *et al.*, 2013; INTENGAN *et al.*, 2001).

O remodelamento das AR na HA envolve principalmente o remodelamento eutrófico e o hipertrófico interno, de acordo com a severidade da doença. Os parâmetros mais utilizados para caracterizar o tipo de remodelamento vascular são a área de secção transversal (AST) e a razão média/lúmen (M/L). A AST indica a quantidade de material depositado na parede do vaso; e a M/L indica a capacidade do vaso de contrair a uma dada pressão intravascular. O remodelamento eutrófico interno é o mais comum na HA essencial nos estágios iniciais, é caracterizado pela AST inalterada, com diminuição do diâmetro do lúmen e aumento da M/L. Neste tipo de remodelamento, as CMLV migram para se sobreporem ao lúmen arterial e criarem um rearranjo, para contribuir para a vasoconstrição. No remodelamento hipertrófico interno, característicos de processos mais severos na HA, é evidenciado o aumento da AST e M/L. As CMLV migram e se proliferam no intuito de aumentar a camada média, e aumentando a rigidez arterial. Assim, o remodelamento vascular, progride para alterações funcionais e mecânicas, e pode ocasionar rigidez arterial, com comprometimento das funções cardiovasculares e consequente progressão da HA (SCHIFFRIN, 2001; HEAGERTY *et al.*, 1993; DEMAY *et al.*, 2015).

1.3 Disfunção endotelial e estresse oxidativo via NAD(P)H oxidase na hipertensão arterial

A (DE) está diretamente envolvida com a HA e outras doenças como acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana, insuficiência renal crônica, aterosclerose, trombose, diabetes, doenças auto-imunes, metástases e crescimento de tumor, infecções virais severas, entre outras (RAJENDRAN *et al.*, 2013).

A DE é descrita como a redução da biodisponibilidade de fatores vasorelaxantes, em especial o óxido nítrico (NO), e o aumento de fatores contráteis derivados do endotélio, com prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio. A DE também inclui um estado de ativação endotelial, caracterizado por aumento de fatores pró-inflamatórios, pró-coagulantes, proliferativos e maior estresse oxidativo (LERMAN *et al.*, 1992; ANDERSON *et al.*, 1999). NA HA, as células endoteliais expostas ao aumento do estresse de cisalhamento pelo fluxo sanguíneo convertem o estímulo mecânico exercido em estímulo intracelular e sinais bioquímicos (proliferação e migração, apoptose, permeabilidade, remodelamento, expressão gênica, etc.). Desta forma, a DE está presente em várias doenças, sendo um marcador que precede o desenvolvimento e indica a progressão da HA (LI *et al.*, 2005).

O NO é um agente vasodilatador e um dos maiores reguladores do tono vascular, e desempenha papel anti-trombótico, anti-proliferativo, inibição da migração leucocitária, suprimindo a inflamação na parede vascular. Na HA a produção e biodisponibilidade de NO estão afetadas, contribuindo para DE e complicações cardiovasculares (MINSON, 2008). O NO pode ser sequestrado por EROs incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), resultando na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), que por sua vez, diminui a atividade da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), reduzindo a produção de NO. A maior geração de EROs promove também a ativação e a translocação nuclear do NF κ -B e transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo a sintase induzível de óxido nítrico (iNOS), que produz altas concentrações de NO, contribuindo para nitrosilação oxidativa, aumento de arginase com diminuição da produção de NO pela eNOS via aumento da arginase, resultando em DE e complicações cardiovasculares (OLIVEIRA-PAULA *et al.*, 2014).

As principais fontes de estresse oxidativo na vasculatura são provenientes da enzima fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida [NAD(P)H] e suas subunidades oxidase (NOX), xantina oxidase, disfunção mitocondrial e do desacoplamento da eNOS (FERRONI *et al.*, 2006). O $O_2^{\cdot-}$ também causa a oxidação do 4-tetradihidrobiopterina (BH $_4$), um co-fator para a síntese de NO (WEER, *et al.*, 1998).

Além de reduzir a biodisponibilidade do NO, na HA também ocorre diminuição dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF), dada sua importância no relaxamento vascular em AR (MORI *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007). O endotélio libera fatores de contração, ou fatores contráteis derivados do endotélio (EDCF, *endothelium-derived contracting factor*), como tromboxano A₂, e prostaglandinas H₂. As alterações na liberação e ação destes fatores contribuem para DE na HA. Além do mais, há ainda o aumento da síntese de outros agentes vasoconstritores como a endotelina-1 (ET-1) que induz contração vascular e contribui com a produção de EROs (KONUKOGLU *et al.*, 2016).

As NOXs apresentam uma grande fonte para a produção de EROs vascular. As NOXs são proteínas transmembrana com subunidades reguladoras que catalisam a transferência de elétrons do NAD(P)H, e são importantes fontes de geração do O² e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no sistema cardiovascular (TOUYZ *et al.*, 2011). A desregulação das NOXs leva ao aumento de EROs e resulta em DE e remodelamento na HA. Na HA induzida por ANGII ocorre aumento da geração de EROs via NAD(P)H oxidase, demais modelos de hipertensão também exibem aumento significativo (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996). Ao passo que animais deficientes em enzimas anti-oxidantes apresentam maior PA comparados aos animais com sistema intacto (MONTEZANO *et al.*, 2014). Em humanos com HA, a capacidade de enzimas anti-oxidantes e vitaminas apresentam-se reduzidas, ao passo que indicadores plasmáticos de estresse oxidativo apresentam-se aumentados (LAI *et al.*, 2008; GIUSTARINI *et al.*, 2009).

As NOXs 1, 2, 4 e 5 estão presentes no sistema cardiovascular, incluindo células endoteliais. A NOX 5 não está presente em roedores, não requer subunidades da NAD(P)H oxidase para sua atividade, e consegue gerar EROs em resposta ao aumento das concentrações de cálcio. Os agonistas ANGII e endotelina-1 conseguem estimular a produção de EROs em NOX 5. Camundongos transgênicos que expressam a NOX 5 humana em CMLV, apresentam DE e remodelamento vascular em AR na HA por infusão de ANGII (MONTEZANO *et al.*, 2017; MONTEZANO, *et al.*, 2014).

A NOX1 está presente no epitélio do cólon, cardiomiócitos, micróglia, células endoteliais e CMLV. As NOX 1, NOX 2 e NOX 4 são estimuladas por estresse de cisalhamento, agentes vasoativos (ANGII) e fatores de crescimento (MONTEZANO *et al.*, 2014). Em especial, CMLV estimuladas com ANGII e interleucina (IL)-1 β apresentam sinergismo na expressão de NOX 1, geração de EROs, migração e proliferação, fatores que contribuem para o remodelamento vascular (AGUADO *et al.*, 2016). Em camundongos deficientes de NOX 1, é observado menor PA, menor expressão de receptor de angiotensina do

tipo 1 (AT1), geração de $O_2^{\cdot -}$, prevenção da DE, e estes efeitos são mediados pela biodisponibilidade de NO (MATSUNO *et al.*, 2005).

A NOX 2 está presente em células fagocitárias, fibroblastos na camada adventícia dos vasos sanguíneos, localizando-se entre células endoteliais e adventícia. Camundongos nocautes para NOX 2 apresentaram menor PA basal, hipertrofia arterial e redução da DE quando submetidos a HA dependente de ANGII (WANG *et al.*, 2001; JUNG *et al.*, 2004). Em geral, estudos apontam que a deleção dos genes da NOX1 e NOX2 em modelos de HA reduzem a PA, estresse oxidativo vascular, desacoplamento da eNOS, DE e remodelamento vascular (DRUMOND *et al.*, 2014).

A NOX 4 está presente principalmente em células vasculares, fibroblastos, adipócitos e células renais, produz $O_2^{\cdot -}$ que é rapidamente dismutado a H_2O_2 (WU *et al.*, 2010). Estudos apontam um efeito vasoprotetor da NOX 4, considerando que a super expressão de NOX 4 em camundongos promove maior vasorelaxamento dependente de endotélio em aortas (RAY *et al.*, 2011). De fato, ao utilizar camundongos nocautes para NOX 4 infundidos com ANGII, é observado maior expressão de IL-1 β em aortas torácicas, hipertrofia vascular, diminuição de eNOS, redução de NO, e consequente DE. Em CMLV, o estímulo com IL-1 β promove redução na expressão de NOX 4 e geração de H_2O_2 , porém aumenta a expressão de NOX 1, com aumento da geração de $O_2^{\cdot -}$, migração e proliferação (AGUADO *et al.*, 2016). Baseado nos estudos citados, é possível concluir que as NOXs desempenham um papel importante na geração de EROs e consequente DE e remodelamento vascular na HA dependente de ANGII. Todavia, é possível evidenciar em parte a participação da ANGII e IL-1 β na geração do estresse oxidativo via NOXs, e nas alterações vasculares.

1.4 Ativação do inflamassoma NLRP3 e liberação de IL-1 β na hipertensão arterial

Nas últimas décadas, tem-se demonstrado a importância da inflamação crônica de baixo grau como um importante mediador na iniciação e manutenção da elevação da PA (HARRISON, 2014). Os processos inflamatórios vasculares ocasionam DE, remodelamento vascular acompanhado de fibrose e rigidez arterial, contribuindo para a elevação da resistência vascular sistêmica e complicações cardiovasculares na hipertensão (MCMASTER, 2015). O sistema imune inato e adaptativo contribui para a inflamação de baixo grau, e desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão da hipertensão e lesão nos órgãos-alvo como os vasos sanguíneos, rins e coração (CAILLON *et al.*, 2016). Todos os mecanismos

inflamatórios como adesão celular, expressão de quimiocinas, ativação de células imunes e infiltração, liberação de citocinas e estresse oxidativo, estão significativamente aumentados na HA (SCHIFFRIN, 2011).

Os estímulos hipertensivos são diversos e incluem atividade aumentada do sistema nervoso simpático e atividade diminuída do sistema nervoso parassimpático. Ademais, agentes vasoativos como ANGII, endotelina-1 (ET-1) e aldosterona, e outros como a elevada ingestão de sal e suscetibilidade genética contribuem para o aumento inicial da PA (HARRISON *et al.*, 2014; CAILLON *et al.*, 2016). Esse efeito “pré-hipertensivo” pode resultar em lesão tecidual de baixo grau nos vasos sanguíneos, rins e coração, ocorrendo a formação de padrões associados a danos celulares (*damage-associated molecular patterns* - DAMPs) e neoantígenos. A habilidade de ativar células do sistema imune depende da presença dos receptores de reconhecimento padrão (PRR), como os receptores do tipo *toll* (TLR) e NLR (*NOD-like receptors* – NLRs), que são capazes de detectar padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*- PAMPs), mas também detectar DAMPs. O sistema imune inato contribui aumentando a inflamação e estresse oxidativo diretamente ou devido a ativação do sistema imune adaptativo, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e auto-anticorpos. Os efeitos combinados com a ativação crônica persistente do sistema imune inato e adaptativo, inflamação, estresse oxidativo promovem a progressão da hipertensão e resultam em disfunção e fibrose vascular, lesão renal e cardiovascular (HARRISON *et al.*, 2014; CAILLON *et al.*, 2016; BONFIM *et al.*, 2017).

Um dos PRRs que contribui para a inflamação crônica de baixo grau e consequente aumento da PA, é a plataforma molecular dos NLRs, o mais bem caracterizado é o NLR do tipo 3 (NLRP3). A ativação do NLRP3 culmina na liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-18 e IL-1 β . Vários eventos moleculares e celulares foram propostos como gatilhos para a ativação do NLRP3. Na hipertensão, certos DAMPs são considerados ativadores “clássicos” do inflamassoma NLRP3. Esses estímulos incluem, microcristais, cristais de urato monossódico, altos níveis de ATP extracelular provenientes de dano celular que aumentam o efluxo de K⁺, e EROs (SCHRODER *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2016).

A ativação do NLRP3 ocorre em dois processos, a transcrição e a oligomerização. A interação de TLRs com PAMPs ou DAMPs, ou por receptor de citocinas com seus respectivos ligantes, promove a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e resulta no processo de transcrição de pró-IL-1 α , pró-IL-1 β e NLRP3. A pró-IL-18 é expressa constitutivamente com expressão aumentada após ativação celular. A segunda etapa envolve a detecção de DAMPS

pelo NLRP3 como gatilho para sua oligomerização e ativação dependente da interação com a outra proteína do complexo, a proteína partícula-símile associada à apoptose (ASC- *apoptosis-associated speck-like protein*), e a protease pró-caspase 1 (TSCHOOP *et al.*, 2011, LI *et al.*, 2014).

O NLRP3 possui três domínios principais, uma região C-terminal de repetições ricas em leucina (LRR) sensível a PAMPs/DAMPs, um domínio central de ligação de nucleotídeos (NACHT) e um domínio de pirina N-terminal (PYD) (SCHRODER *et al.*, 2010). A segunda etapa serve como gatilho para a ativação do complexo inflamassoma. O NLRP3 após detectar DAMPs e/ou PAMPs se oligomeriza de maneira dependente de trifosfato de adenosina (ATP), para interagir com o domínio PYD da ASC. O outro domínio da ASC, o domínio N-terminal de recrutamento de caspase (CARD-*caspase recruitment domain*), por sua vez recruta o CARD da pró-caspase 1. Após a ligação, a pró-caspase 1 se auto-cliva em caspase 1 ativa. A caspase 1 ativa proteoliticamente a pró-IL-1 β e a pró-IL-18 em suas formas ativas, a IL-1 β e IL-18, contribuindo para a resposta inflamatória e dano celular por autofagia e piroptose. A ativação da caspase-1 também induz a piroptose por clivar a gasdermina D (SCHRODER *et al.*, 2010, BROUGH *et al.*, 2007). O processo de ativação do NLRP3 está ilustrado na figura 1.

Além do mecanismo de proteção, o inflamassoma NLRP3 desempenha um papel crucial na patogênese de diversas doenças inflamatórias, autoimunes e metabólicas (MANGAN *et al.*, 2018). Recentemente, tem-se demonstrado que polimorfismos no gene associado a transcrição do NLRP3 resulta em maior susceptibilidade a HA essencial em humanos, bem como aumento na PA relacionado com aumento da idade (KUNNAS *et al.*, 2015; OMMA *et al.*, 2015). Em diversos modelos animais de HA, incluindo ratos espontaneamente hipertensos (SHR), modelo 2 rins um clipe (2R-1C) e ratos Dahl sensíveis ao sal (DSS- *Dahl-salt sensitive*), a expressão de NLRP3, caspase-1 e IL-1 β estavam aumentadas nos rins destes animais, e em aortas dos ratos SHR. Além do mais, o aumento da PA e lesão renal promovido pelos modelos de HA citados, e expressão de NLRP3, caspase-1 e IL-1 β foram prevenidas ao utilizar nocautes para NLRP3 ou ASC (HONG *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2012; KRISHNAN *et al.*, 2016). Ademais, BRUDER-NASCIMENTO *et al.*, demonstrou que a infusão crônica de aldosterona resulta no aumento da expressão e concentração circulante de IL-1 β e DE em artérias mesentéricas de resistência (AMR) e que esses eventos são dependentes de células do sistema imune. Ao passo que, animais nocautes para IL-1RI, NLRP3 e caspase-1 foram protegidos destes eventos. Em adição, o tratamento com um antagonista do NLRP3, o MCC950, em camundongos submetidos ao modelo de HA com nefrectomia unilateral e tratamento com acetato de desoxicorticosterona

e cloreto de sódio (DOCA-sal), foi capaz de reduzir a pressão arterial, dano renal e expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 β (KRISHNAN *et al.*, 2018). Desta forma, a ativação do inflamassoma NLRP3 e das citocinas liberadas mediante sua ativação, tornam-se possíveis alvos terapêuticos no tratamento da HA.

Figura 1- Representação esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3 e liberação das interleucinas IL-1 β e IL-18.

Fonte: Adaptado de SCHRODER *et al.*, 2010.

1.5 Sistema Renina-Angiotensina e IL-1 β na hipertensão arterial

A ativação inapropriada do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) resulta em HA, com consequente ativação da resposta imune com inflamação vascular e renal. As ações da ANGII via AT1, acoplado a proteína G, são responsáveis por promover retenção renal de sódio e vasoconstrição, contribuindo para lesão em órgão-alvo (RUDEMILLER *et al.*, 2016).

A injeção intracerebral de ANGII aumenta a PA e a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β no baço pela ativação de nervos simpáticos (GANTA *et al.*, 2005). Além do mais, as respostas da ANGII envolvem a mobilização e recrutamento de células do

sistema imune que por sua vez, resultam na infiltração de linfócitos T no sistema nervoso central, e resulta em uma exacerbada ativação de nervos simpáticos (MARVAR *et al.*, 2010).

A ausência das ações de citocinas ou a inibição da proliferação de linfócitos é capaz de aumentar a taxa de sobrevivência e diminuir dano renal em modelo de HA dependente do SRA (MULLER *et al.*, 2002). Em adição, camundongos com ausência de linfócitos são protegidos da HA por ANGII, com resposta vasodilatadora e natriurética preservada na HA por infusão de ANGII (CROWLEY *et al.*, 2010).

A ANG II e o estresse oxidativo promovem a ativação do NF- κ B, estimulando a produção de NLRP3 e pró-IL-1 β (ZAHRAKKA *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2014). Além disso, em CMLV estimuladas simultaneamente com ANGII e IL- β é observado sinergismo na atividade de NAD(P)H oxidase, expressão de NOX-1, produção de ânion superóxido O⁻² e aumento da migração e proliferação celular (AGUADO *et al.*, 2015). O estímulo com ANGII é capaz de aumentar as concentrações de IL-1 β em monócitos de pacientes hipertensos, ao passo que a incubação prévia com antagonista AT1 é capaz de prevenir este aumento (LI *et al.*, 2005). Assim, as ações combinadas da ANGII e IL-1 β contribuem para eventos que culminam no aumento do estresse oxidativo, remodelamento e injúria vascular.

1.6 Interleucinas do tipo 1 e seus respectivos receptores na hipertensão arterial

As IL-1 α e IL-1 β fazem parte da família de IL do tipo 1 (IL-1). A família de citocinas IL-1 engloba 11 proteínas oriundas de 11 genes distintos. A principal função das citocinas IL-1 é controlar reações pró-inflamatórias frente a lesão tecidual causada por DAMPs ou PAMPs, sendo um dos principais mediadores da resposta imune inata e consequente resposta imune adaptativa (WEBER *et al.*, 2012).

A IL-1 α é expressa constitutivamente por diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais, CMLV e células do sistema imune. Um dos mecanismos mais clássicos para a maturação desta citocina envolve a protease de membrana, a calpaína, que é responsável por clivar pró-IL-1 α em IL-1 α . Ambas pró-IL-1 α e IL-1 α são igualmente ativas. Vale ressaltar que na maioria dos eventos celulares, as formas imatura e madura da IL-1 α permanecem no citosol, a menos que ocorra morte celular para sua liberação (DINARELLO *et al.*, 1993; DI PAOLO *et al.*, 2016). Adicionalmente, frente a estímulos infecciosos ou pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a IL-1 α pode dar origem a IL-1 α de membrana plasmática, susceptível a clivagem por

proteases extracelulares (granzima B, elastase), e atuar ativamente como IL-1 α no meio extracelular. Porém, a calpaína é um fator limitante para a formação da IL-1 α de membrana plasmática, pois pode clivá-la intracelularmente (DI PAOLO *et al.*, 2016). A IL-1 α é reconhecida como um mediador de respostas inflamatórias após injúria celular, principalmente as que acompanham necrose celular, na qual ocorre sua maior liberação (ENGLANG *et al.*, 2014).

A IL-1 β é considerada parte da resposta aguda à inflamação, ao se ligar em seu receptor do tipo IL-1RI para IL-1 β desempenha ações nas células do sistema imune, e ações diretas na parede vascular (DINARELLO, 2002; KRISHNAN *et al.*, 2014). Macrófagos e monócitos são as principais fontes de IL-1 β , e outras também incluem células renais tubulares, CMLV e endoteliais, em decorrência de efeitos pró-hipertensivos (DINARELLO *et al.*, 2013). A presença desses receptores em células constitutivas como parede dos vasos, contribuem para a inflamação vascular e renal na hipertensão (KRISHNAN *et al.*, 2014).

A IL-1 β causa febre frente a determinadas condições inflamatórias, em especial a associada a patógenos. A IL-1 β estimula a polarização de células T auxiliares 17 e 1, com a liberação de IL-6 e IL-17, sendo estas, citocinas e células imunes envolvidas na HA (LEE *et al.*, 2004). A IL-1 β exerce suas ações pró-inflamatórias via IL-1RI. Entretanto, existe a competição pelo receptor com o antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) e IL-1 α . A afinidade dos ligantes para IL-1RI ocorre na seguinte sequência IL-1 α > IL-1Ra > IL-1 β . A IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra, ligam-se ao IL-1RI, seguido do recrutamento da proteína acessória do receptor de IL (IL-1RAcP). A cascata pró-inflamatória da IL-1 β e IL-1 α pode ser interrompida pela competição da IL-1Ra pelo IL-1RI, impedindo a formação de um complexo com IL-1RAcP (GARLANDA *et al.*, 2005; WEBER *et al.*, 2010; DINARELLO, 2011; KRISHNAN *et al.*, 2014).

A IL-1 α e IL-1 β ao se ligarem formam um complexo com IL-1RI e IL-1RAcP, e a cascata de sinalização é inicializada, promovendo o recrutamento de proteínas intracelulares para os domínios citoplasmáticos do receptor Toll/IL-1 (TIR) da IL-1RI e IL-1RAcP. Esses domínios recrutam o gene de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (Myd88) e recrutam e fosforilam as proteínas quinases ativadas pelo receptor de IL-1 (IRAK): a IRAK-4, seguida por IRAK-1 e IRAK-2. A IRAK-1 e IRAK-2 recrutam o fator associado ao receptor de TNF 6 (TRAF6), que por sua vez, promove a ativação do NF κ B. A ativação permite a translocação do NF- κ B para o núcleo e a expressão de diversos genes inflamatórios, incluindo

o NLRP3, caspase-1, pró-IL-1 α e pró-IL-1 β (GARLANDA *et al.*, 2005; WEBER *et al.*, 2010; DINARELLO, 2011; KRISHNAN *et al.*, 2014).

A IL-1 α e IL-1 β podem também se ligar ao receptor de IL tipo II (IL-1RII), que por sua vez, recruta IL-1RIAcP, mas devido à ausência do domínio citoplasmático TIR, crucial para ligação com Myd88, a cascata de sinalização é interrompida. O IL-1RII é expresso em menor quantidade em determinados tipos celulares, a exemplo em CMLV, em comparação ao IL-1RI. A afinidade do IL-RII para seus ligantes é de acordo com a seguinte sequência: IL-1 β > IL-1 α > IL-1Ra. Além do receptor de membrana, existe a forma solúvel IL-1RII (sIL-1RII) que liga-se a IL-1 α e IL-1 β circulante, e em adição aos efeitos do IL-1Ra que possui baixíssima afinidade pelo receptor IL-1RII, atuam de forma a inibir as ações da IL-1 α e IL-1 β . Em adição a sua ação neutralizante isolada, o sIL-1RII pode interagir com a forma solúvel do IL-1RIAcP e resultar em um potente sequestrador de IL-1 α e IL-1 β . Recentemente, foi identificada a forma sIL-1RII no citosol, a qual pode ligar-se a pró-IL-1 α com maior afinidade de forma a impedir sua clivagem pela calpaína. Entretanto, em condições de necrose, a caspase-1 cliva o sIL-1RII citoplasmático e permite a liberação e maturação da IL-1 α (GARLANDA *et al.*, 2005; WEBER, *et al.*, 2010; DINARELLO, 2011; KRISHNAN *et al.*, 2014). A figura 2 ilustra a representação esquemática das ações da IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra nos seus respectivos receptores.

Ademais, a IL-1 α e IL-1 β podem ligar-se a outro tipo de receptor de membrana, o SIGIRR (*single Ig IL-1-related receptor*), que também é capaz de prevenir a cascata de sinalização por possuir alterações no domínio TIR. Entretanto, sua expressão em células do sistema imune é baixíssima, sendo mais expressa em células epiteliais do intestino, rim e pulmão (POLENTARUTTI *et al.*, 2003).

Ao considerar a HA essencial, os genes associados ao polimorfismo da IL-1 α , e do IL-1Ra não apresentaram susceptibilidade a HA em pacientes chineses. Em contrapartida, polimorfismo no gene da IL-1 β demonstra associação com a susceptibilidade a HA (LI *et al.*, 2004). Estudos adicionais demonstram que polimorfismos nos genes responsáveis por IL-1Ra e IL-1 β estão altamente associados com o desenvolvimento de complicações cardiovasculares como a síndrome coronariana aguda (SOYLU *et al.*, 2008; FRAGOSO *et al.*, 2010).

No contexto de interação citocina-receptor, em modelos animais de HA dependentes de ANGII, as concentrações circulantes e vasculares de IL-1 β encontram-se elevadas (BIVOL *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2017). Ademais, em pacientes hipertensos, o aumento sérico de IL-1 β correlaciona-se com o aumento da PA (DALEKOS *et al.*, 1996).

A IL-1 β está intimamente ligada com a inflamação vascular e exerce efeitos diretos na parede dos vasos como: DE, aumento da resposta contrátil em artérias sem endotélio, aumento da migração e proliferação de CMLV, resultando em remodelamento vascular, processos esses cruciais para as complicações da HA (KRISHNAN *et al.*, 2014; ABDERRAZAK *et al.*, 2015; AGUADO *et al.*, 2015). Tais efeitos ocasionados pela IL-1 β nos vasos sanguíneos desempenham um papel pró-hipertensivo, justificando a importância no desenvolvimento de estudos abordando-a como possível alvo terapêutico para proteção vascular na HA.

A IL-1 β e o estímulo com ANGII são capazes de aumentar a migração, proliferação, geração de EROs via NOX 1 em CMLV (AGUADO, *et al.*, 2011). Em conjunto, o estímulo de IL-1 β e ANGII também é responsável por aumentar a atividade e a expressão das metaloproteinases de matriz (MMP) do tipo 2 e 9, e consequente migração e proliferação de CMLV. Estes eventos cruciais para o remodelamento vascular, sugerem ser mediados via NF κ -B, proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK) e c-Jun quinase N-terminal (JNK) (WANG *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2007).

A IL-1 β além de contribuir para o remodelamento vascular, ao ligar-se no IL1-RI resulta em DE nas AMR *in vitro*. A DE é mediada pela produção de EROs, devido ao aumento da produção de O $_2^{\cdot -}$ pela NAD(P)H oxidase e xantina oxidase. Contudo, a incubação dessas artérias com a enzima superóxido dismutase (SOD) ou a apocinina é capaz de reverter a DE (JIMÉNEZ-ALTAYO *et al.*, 2006, VALLEJO *et al.*, 2014). Entretanto, estudos apontando a contribuição da IL-1 β via IL-1RI e estresse oxidativo gerado na disfunção e remodelamento vascular na HA induzida por ANGII são necessários.

Figura 2- Representação das ações da IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra nos seus respectivos receptores.

Fonte: Adaptado de GARLANDA *et al.*, 2013.

Justificativa e hipótese

2.0 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A inflamação crônica de baixo grau configura um evento crucial para o desenvolvimento e progressão da HA. Em adição, estudos demonstram a participação dos componentes do sistema imune inato e adaptativo em eventos que antecedem a HA, entre eles, a DE e o remodelamento vascular. Entretanto, raros estudos enfatizaram o papel do IL-1RI na DE e remodelamento vascular de AMR no contexto da HA. Considerando a alta incidência de HA e as lesões em órgãos-alvos resultantes, torna-se de extrema importância a busca de novos alvos terapêuticos para o tratamento desta doença.

As evidências descritas sugerem a participação do IL-1RI na HA, com consequente impacto na DE, remodelamento vascular e geração de EROs. Portanto, o presente estudo testou a hipótese de que a IL-1RI contribui para o estresse oxidativo, e promove DE e o remodelamento vascular na hipertensão induzida por ANGII. Sendo assim, utilizamos camundongos nocautes para o receptor IL-1RI como ferramenta para determinar as alterações estruturais e funcionais da vasculatura de animais hipertensos pela infusão de ANGII. A figura 3 mostra um esquema representativo da hipótese deste estudo.

Figura 3– Esquema representativo da hipótese deste estudo.

Objetivo

3.0 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do IL-1RI na disfunção e remodelamento vascular e participação na geração de estresse oxidativo em modelo experimental de HA induzida por ANGII.

3.1 Objetivos específicos

- Induzir o aumento da PA pela infusão de ANGII em camundongos, e avaliar se o IL-1RI contribui para a alteração da PA.
- Determinar se o IL-1RI é capaz de alterar a resposta contrátil à fenilefrina em AMR de camundongos submetidos a hipertensão por ANGII.
- Avaliar se o IL-1RI contribui para a disfunção endotelial em AMR de camundongos submetidos a hipertensão por ANGII.
- Analisar se o IL-1RI participa nas alterações mecânicas e estruturais de AMR em modelo de hipertensão por ANGII.
- Determinar se camundongos submetidos a hipertensão por ANGII apresentam aumento das concentrações séricas de IL-1 β .
- Verificar se o IL-1RI contribui para o aumento da geração de EROs em AMR de camundongos infundidos com ANGII.
- Avaliar se o IL-1RI contribui para hipertrofia de cardiomiócitos na HA por ANGII

Materiais e métodos

---

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 179/2017), com os princípios éticos em experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (ANEXO 1).

Foram utilizados camundongos machos nocaute para o receptor IL-1RI (IL-1RI^{-/-}) da linhagem C57BLKS/JL, provenientes do Biotério do Departamento de Imunologia. O grupo controle macho tipo selvagem (WT- *Wild-Type*) com linhagem C57BL/6J foram provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP. Os camundongos nocautes são homozigotos para uma mutação no receptor IL-1RI.

4.2 Indução da hipertensão arterial

Os camundongos IL-1RI^{-/-} e WT, com 12 a 14 semanas de idade foram infundidos com ANGII (1µg/kg/min, por 14 dias) diluída em salina, por meio de implante subcutâneo de mini-bomba osmótica (Alzet) (GOMOLAK *et al.*, 2014). O implante foi conduzido com os animais sob anestesia com isoflurano (3%), e após o procedimento foi administrado tramadol (12,5mg/kg), em dose única, subcutâneo para garantir analgesia. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) WT + SHAM; 2) WT + ANGII; 3) IL-1RI^{-/-} + SHAM; 4) IL-1RI^{-/-} + ANGII.

4.3 Avaliação da pressão arterial

A avaliação da PA foi realizada pelo método não-invasivo e invasivo. O método não-invasivo envolveu a realização da pletismografia de cauda com três dias de treinamento para habituação do camundongo. O manguito foi inserido de forma não-invasiva em torno da cauda para medida da PA, no qual o camundongo é acondicionado em um tubo de acrílico. O valor da pressão arterial sistólica (PAS) de cada animal foi obtido através da média aritmética de três medidas em um ciclo de treze medidas da PAS, a fim de obter o valor basal e monitoramento nas duas semanas de infusão com ANGII.

O método invasivo para avaliação da PA foi por canulação da artéria carótida. O cateter para detectar as oscilações na pressão arterial média (PAM) foi inserido na artéria carótida esquerda e preenchido com solução salina. A administração subcutânea de tramadol (12,5mg/kg), em dose única, foi realizada para promover analgesia pós-operatória. Seguido 2 dias de recuperação da inserção da cânula, o cateter foi conectado a um transdutor de pressão para a transdução do sinal de pressão para um sinal elétrico através do sistema de aquisição de dados (Power Lab/8S, ADInstruments PTY Ltda, Austrália) acoplado a um computador (ZHAO *et al.*, 2011). A PAM e frequência cardíaca (FC) foi registrada após adaptação do animal por 10 minutos e ocorreu o registro das medidas mencionadas por mais 10 minutos.

4.4 Avaliação da função vascular

A fim de avaliar a reatividade de AMR foi utilizado o método descrito por Mulvany & Halpern (1977). Os camundongos foram anestesiados com isoflurano 3% por via inalatória, a cavidade peritoneal foi exposta e a eutanásia ocorreu por dessangramento pela secção da artéria aorta abdominal. Após verificar a ausência de sinais vitais, o procedimento para retirada do intestino foi realizado para obter a arcada mesentérica mantida em solução Krebs-Henseleit (SKH). Artérias mesentéricas de segunda ordem (2mm de comprimento, diâmetro interno menor que 300µm) foram isoladas, livres de tecido adiposo perivascular, e em seguida, dois fios de tungstênio de 25µm foram inseridos no lúmen das artérias. Um dos fios foi acoplado a um transdutor de tensão e o outro, a um micrômetro que permite o estiramento da artéria. A montagem no miógrafo de pequenos vasos, modelo 620M (Danish Myo Technology, Dinamarca) foi realizada para registro da tensão isométrica por sistema de aquisição de dados (Power Lab/8S) acoplado a um computador.

As AMR foram mantidas em SKH [(em mM): NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,9; Glicose 5,5; EDTA 0,03; CaCl₂ 1,6], a uma temperatura constante de 37°C e gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e mantida em pH 7,4. As preparações de AMR foram normalizadas até atingirem uma tensão de 13,3kPa e permaneceram em repouso durante 30 minutos para estabilização. Em seguida, as AMR foram estimuladas com solução de Krebs com alta concentração de cloreto de potássio (KCl, 120 mM) para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos, e então, a viabilidade do vaso. Após o retorno das AMR à sua tensão basal, a presença de endotélio funcional foi determinada através do relaxamento

promovido pela acetilcolina (ACh) 10^{-4} M após a pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M, se mantendo estável por 5 minutos. As AMR com endotélio funcional foram as que apresentaram relaxamento maior que 80% em resposta a 10^{-4} M de acetilcolina. Após lavagem e novo período de estabilização, foram iniciadas as curvas concentração-resposta.

A resposta vasoconstritora foi avaliada utilizando-se curvas cumulativas concentração-efeito para Fe (10^{-10} a 3×10^{-5} M) e os resultados foram expressos como porcentagem da contracção máxima exercida pelo KCl 120mM.

As curvas cumulativas concentração-efeito para avaliar a resposta vasodilatadora endotélio-dependente foram realizadas utilizando a ACh (10^{-10} a 3×10^{-5} M), após a pré-contracção com Fe (10^{-6} M).

A resposta de relaxamento vascular independente do endotélio foi avaliada com o nitroprussiato de sódio (NPS) (10^{-10} a 3×10^{-5} M) após a pré-contracção com Fe (10^{-6} M).

Os resultados foram expressos em relação a porcentagem da pré-contracção. A análise das curvas concentração-efeito considerou o efeito máximo produzido pelo agonista (E_{max}) e o logaritmo negativo da concentração que induz 50% do efeito máximo (pEC_{50}).

4.5 Análise mecânica arterial

As propriedades estruturais e mecânicas de AMR de segunda ordem foram determinadas utilizando-se o miógrafo para vasos pressurizados (Danish Myo Tech, Dinamarca) conforme publicações anteriores (BRIONES *et al.*, 2009). Após procedimentos padrões, as AMR foram canuladas em suas extremidades entre duas pipetas de vidro com fio de sutura de nylon. Após verificar a viabilidade do vaso com SKH com KCl 120mM, e manutenção de pressão ao ambiente externo, a pressão intraluminal de 80mmHg foi escolhida como parâmetro para avaliar as propriedades mecânicas. Os protocolos foram realizados em SKH sem cálcio, a fim de verificar as propriedades passivas do vaso pela obtenção do diâmetro externo (De) e diâmetro interno (Di) pelo software (MyoVIEW II, Danish Myo Tech, Dinamarca). A área de secção transversa foi obtida utilizando fórmulas descritas anteriormente $(\pi/4) \times (De^2 - Di^2)$, indicando a quantidade de material existente na parede vascular a uma dada pressão transmural. A razão média/lúmen (M/L) foi obtida pela fórmula $(De - Di) / 2Di$, e indica a capacidade do vaso de contrair a uma determinada pressão transmural (MULVANY, 1999).

4.6 Análise estrutural das artérias mesentéricas de resistência

As AMR de segundo ramo foram obtidas como descrito no item 4.4, provenientes dos grupos descritos e foram acondicionadas em formol tamponado 10% durante 24 horas, seguido de transferência em álcool 70%. Os tecidos foram fixados, desidratados e emblocados em parafina. Os cortes de 4 µm de espessura foram dispostos em lâmina para microscopia. As lâminas foram coradas de acordo com a técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE) para exame microscópico. A análise da imagem foi realizada pelo software Image J, e obteve-se os parâmetros M/L e AST.

4.7 Dosagem sérica de IL-1β

A quantificação da concentração sérica de IL-1β foi detectada através do método imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) com base na reação antígeno-anticorpo detectável na reação enzimática. As amostras de sangue dos grupos experimentais foram centrifugadas a 1500rpm a 4°C por 15 min e armazenadas a -80°C. Os protocolos foram seguidos de acordo com o manual do fabricante dos kits (R&D systems, USA). As amostras de soro 100µl foram pipetados em placa de 96 poços (fornecida pelo kit), seguido de incubação por 2 horas e 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem fornecida pelo kit e, posteriormente, foram adicionados 100µl de anticorpo biotilado por 1 hora. Em seguida, foram realizadas mais quatro lavagens e 100µl do conjugado estreptavidinaperoxidase (diluído 400x) foram adicionados por poço, por 45 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, mais quatro lavagens foram realizadas e adicionados 100µl do substrato tetrametilbenzidina (TMB) por 30 minutos. Para finalizar, foram adicionados 50µl de “*STOP solution*” e realizada a leitura nos comprimentos de onda de 450-550 nm com o equipamento FlexStation® e o software SoftMax® Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

4.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio

A quantificação de EROs, geração de O² foi mensurada por ensaio de quimioluminescência, utilizando a lucigenina como acceptor de elétrons e o NAD(P)H como substrato. Os resultados foram calculados pela subtração da luminescência após a adição de NAD(P)H pelo valor de luminescência na ausência do NAD(P)H (basal).

O leito mesentérico dos grupos de animais do estudo foram colocados em tubos de vidro contendo 950 µl de solução HANK'S [(em mM): NaCl 120, CaCl₂ 1,6, KCl 5, MgCl₂ 6H₂O 1, NaH₂PO₄ 0,5, Glicose 10, HEPES 10) e 5 µl de lucigenina (5 µM) para leitura basal da luminescência. Seguido da leitura basal, 50 µl de NAD(P)H (100 µM) foram adicionados ao tubo para leitura da geração de superóxido. Foi utilizado o luminômetro de microplaca (LB 690, Alemanha). A geração de ânion superóxido foi expressa em unidades relativas de luminescência (URL) (NAD(P)H – basal) e corrigida pela concentração proteica da amostra, a qual foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951).

4.9 Análise histológica do coração

Os corações obtidos durante a eutanásia dos animais foram perfundidos com SKH para retirada de sangue e, em seguida, com solução de KCl 1M para parada cardíaca em diástole. Os corações foram acondicionadas em formol tamponado 10% durante 48 horas, seguido de transferência em álcool 70%. Os tecidos foram fixados, desidratados e emblocados em parafina. Os cortes de 6 µm de espessura foram dispostos em lâmina para microscopia. As lâminas foram coradas de acordo com a técnica de coloração com HE para exame microscópico. A análise da imagem foi realizada pelo software Image J, e obteve-se a média da área do cardiomiócito.

4.10 Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram analisados pelo teste de análise de variância de duas vias (ANOVA) de múltiplas comparações, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os resultados de reatividade vascular, as curvas concentração-efeito individuais foram plotadas em uma curva sigmoide e determinadas por análise de regressão não-linear. Estas curvas, por sua vez, fornecem a pEC_{50} (definida como o logaritmo negativo dos valores de EC_{50} – concentração que produz 50% da resposta máxima) e a resposta máxima ($Emax$). Os valores de pEC_{50} e de resposta máxima foram comparados por meio da análise de variância de duas vias (ANOVA) de múltiplas comparações, seguido do pós-teste de Bonferroni

O programa GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Inc, USA) foi utilizado para analisar estes parâmetros, e para a elaboração dos gráficos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). O nível de significância mínima aceitável foi de $p < 0,05$.

Resultados

5.0 RESULTADOS

5.1 Análise da pressão arterial e frequência cardíaca

A partir do sétimo dia de infusão de ANGII o aumento da PA foi constatado em animais do grupo WT + ANGII em comparação ao grupo WT + SHAM. Este aumento permaneceu sustentado até o décimo quarto dia de infusão (Figura 4-A).

A deleção gênica do receptor IL-1RI não foi capaz de prevenir o aumento da PAS no sétimo dia de infusão com ANGII em comparação aos grupos SHAM (Figura 4A). Entretanto, no décimo quarto dia de infusão com ANGII, animais nocautes para IL-1RI apresentaram diminuição significativa da PAS em comparação ao grupo WT + ANGII (Figura 4A). Apesar desta diminuição, os níveis pressóricos ainda foram maiores do que em animais do grupo WT SHAM.

A análise da PA pelo método de canulação da artéria carótida demonstrou o aumento na PAM dos animais após 14 dias de infusão com ANGII, nos WT, e em animais IL-1RI^{-/-} em comparação aos respectivos grupos SHAM. Nenhuma diferença estatística significativa foi evidenciada entre os grupos WT + ANGII e IL-1RI^{-/-} + ANGII (Figura 4-B).

A FC dos animais após 14 dias de infusão com ANGII não diferiu em relação ao grupo WT em comparação ao grupo controle. A FC também não apresentou diferença significativa nos animais IL-1RI^{-/-} + ANGII em comparação ao seu grupo controle (Figura 4-C).

4-A

4-B

4-C

Figura 4- Medida da PA por pletismografia de cauda (A) e canulação direta da artéria carótida (B e C). (A) PAS em camundongos WT ou IL-1RI^{-/-}, SHAM ou infundidos com ANGII, n=6-7 (B) Pressão arterial média e (C) Frequência cardíaca, n=3-6. Os dados foram expressos como média ± EPM, *, p < 0,05 vs grupo SHAM, #, p < 0,05 vs WT + ANGII.

5.2 Avaliação da função vascular contrátil e vasodilatadora dependente e independente de endotélio

A resposta vasoconstritora à Fe em AMR não diferiu entre os grupos do estudo (Figura 5-A).

Os animais WT infundidos com ANGII apresentaram diminuição na resposta máxima da ACh (relaxamento dependente do endotélio) em comparação ao seu grupo SHAM. O prejuízo da resposta de relaxamento dependente do endotélio em AMR foi prevenido em animais com a deleção gênica do receptor IL-1RI infundidos com ANGII (Figura 5-B).

A infusão com ANGII não alterou a resposta vasodilatadora induzida por NPS (relaxamento independente de endotélio) nos grupos do estudo (Figura 5-C).

Os valores de $E_{\text{máx}}$ e pEC_{50} da figura 5 constam na tabela 1.

Figura 5- Curvas concentração-resposta para (A) fenilefrina (Fe), (B) acetilcolina (ACh) e (C) nitroprussiato de sódio (NPS) em artérias mesentéricas isoladas de camundongos WT e IL-1RI^{-/-} SHAM ou infundidos com ANGII. Cada ponto representa a média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. respectivo grupo SHAM e IL-1RI^{-/-} + ANGII. N=7-12.

Tabela 1- Valores de $Emáx$ e pEC_{50} das curvas concentração-efeito para o agonista contrátil Fe e para os agonistas vasodilatadores ACh e NPS em AMR dos animais WT e IL-1RI^{-/-} SHAM ou infundidos com ANGII.

Agonista contrátil	WT SHAM	WT ANGII	IL-1RI^{-/-} SHAM	IL-1RI^{-/-} ANGII
Fe				
$Emáx$	144 ± 5	142 ± 4	148 ± 7	148 ± 5
pEC_{50}	6,04 ± 0,06	6,13 ± 0,05	6,29 ± 0,10	6,17 ± 0,07
Agonista vasodilatador	WT SHAM	WT ANGII	IL-1RI^{-/-} SHAM	IL-1RI^{-/-} ANGII
ACh				
$Emáx$	99 ± 8	75 ± 7*	99 ± 5	99 ± 6
pEC_{50}	7,66 ± 0,42	7,69 ± 1,01	6,85 ± 0,17	6,97 ± 0,44
NPS				
$Emáx$	97 ± 5	100 ± 4	107 ± 8	103 ± 4
pEC_{50}	7,75 ± 0,17	8,00 ± 0,15	7,02 ± 0,19	7,08 ± 0,11

Resultados representados como média ± EPM, *, $p < 0,05$ vs. respectivo grupo SHAM. WT + SHAM n=12; WT + ANGII n= 12; IL-1RI^{-/-} + SHAM n= 7; IL-1RI^{-/-} + ANGII n= 12.

5.3 Análise estrutural e mecânica das artérias mesentéricas de resistência

Ao realizar a análise estrutural, não houve diferença significativa entre os grupos do estudo na AST das AMR (Figura 6-A).

A razão M/L foi maior nos animais WT + ANGII em comparação ao seu grupo SHAM. Ao passo que a ausência do IL-1RI em animais infundidos com ANGII preveniu o aumento da razão M/L. A preservação da AST com aumento da M/L indicou remodelamento eutrófico do tipo interno nos animais WT + ANGII. (Figura 6-B).

A análise mecânica arterial não detectou diferença significativa nos grupos do estudo nos parâmetros AST e razão M/L nas AMR (Figura 6-D e 6-E).

Figura 6- Análise da estrutura vascular- Área de secção transversal (AST) (A) e razão Média/Lúmen (M/L) (B) em AMR dos grupos WT e IL-1R^{-/-} + SHAM ou infundidos com ANGII. (C) Imagem representativa da análise estrutural das AMR em escala de 20 μm . Análise da estrutura mecânica- AST (D) e M/L (E) em AMR a 80mmHg em solução de Krebs livre de cálcio em miógrafo pressurizado; WT e IL-1R^{-/-} SHAM ou infundidos com ANGII. Cada ponto representa a média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. WT + SHAM; **, $p < 0,05$ vs IL-1R^{-/-} + ANGII; N=3-5

5.4 Avaliação das concentrações séricas de IL-1 β

O aumento pronunciado das concentrações séricas de IL-1 β ocorreu em animais WT infundidos com ANGII comparado ao seu grupo SHAM. Entretanto, os animais IL-1RI $^{-/-}$ + ANGII não apresentaram aumento nas concentrações séricas de IL-1 β comparado ao seu grupo SHAM. (Figura 7).

7-

Figura 7- Concentrações de IL-1 β no soro de animais WT e IL-1RI $^{-/-}$ SHAM ou infundidos com ANGII; n=3-5. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; *, p< 0,05 vs respectivo grupo SHAM.

5.5 Detecção de espécies reativas de oxigênio

Os animais WT + ANGII apresentaram aumento significativo na geração de O_2^- em comparação ao seu grupo SHAM. Em contrapartida, o aumento na geração de EROs foi menor nos animais IL-1RI^{-/-} + ANGII em comparação ao seu grupo SHAM (Figura 8).

8-

Figura 8- Detecção da geração de ânion superóxido em AMR de animais WT e IL-1RI^{-/-} SHAM ou infundidos com ANGII, n=3-4. Dados expressos como média ± E.P.M., *, p< 0,05 vs respectivo grupo SHAM.

5.6 Avaliação de hipertrofia dos cardiomiócitos

Os animais WT + ANGII apresentaram aumento significativo do tamanho dos cardiomiócitos em comparação ao seu grupo SHAM. Ao passo que os animais IL-1RI^{-/-} infundidos com ANGII foram capazes de prevenir a hipertrofia dos cardiomiócitos (Figura 9-A e B).

9-A

9-B

Figura 9- (A) Avaliação da hipertrofia dos cardiomiócitos nos corações de animais WT e IL-1RI^{-/-} SHAM ou infundidos com ANGII, n=5-7. (B) Imagem representativa da hipertrofia dos cardiomiócitos, aumento de (40x). Dados expressos com $\pm$ EPM, *, $p < 0,05$ vs respectivo grupo SHAM e IL-1RI^{-/-} + ANGII.

Discussão

6.0 DISCUSSÃO

Os experimentos realizados neste estudo investigaram um dos possíveis mecanismos que sugerem a participação do IL-1RI na DE, remodelamento vascular e geração de EROs na HA induzida por ANGII. Os principais achados do nosso estudo demonstraram que os animais com deleção gênica do IL-1RI foram prevenidos da DE, remodelamento vascular, produziram menor quantidade de EROs nas AMR, e foram capazes de reduzir a hipertrofia em cardiomiócitos em modelo animal de HA com infusão de ANGII.

Diversos estudos demonstraram a participação do IL-1RI e da citocina IL-1 β na HA. As alterações vasculares como a DE e o remodelamento vascular precedem o aumento da PA na HA (KRISHNAN *et al.*, 2014). Ao utilizar anticorpos atuando como antagonista do IL-1RI ou para neutralização da IL-1 β , foi observado redução da PA em diversos modelos de HA. Em modelo de hipertensão em camundongos com infusão de ANGII e DOCA-sal, o tratamento com anakinra (anticorpo anti-IL-1RI) resultou em diminuição da inflamação renal e PA (LING *et al.*, 2016). Em camundongos hipertensos 2R-1C, a administração de anticorpo anti-IL-1 β preveniu o aumento da PA e dano renal (WANG *et al.*, 2014). A infusão de ANGII em camundongos com ausência de IL-1Ra gerou aumento na PA e dano renal comparado a animais do tipo selvagem. Os eventos observados indicam a exacerbação das ações da IL-1 β , uma vez que a administração de anticorpo anti-IL-1 β foi capaz de atenuar esses efeitos (KITAMURA *et al.*, 2017). Em modelo de uninefrectomia seguida por infusão de ANGII por 28 dias, a utilização de nocaute para IL-1RI ou tratamento prévio com anakinra, resultou em atenuação da PA, com menor lesão renal, infiltrado de macrófagos no rim e hipertrofia cardíaca (ZHANG *et al.*, 2017).

A importância da neutralização das ações da IL-1 β isolada ou via IL-1RI, também é refletida em um estudo clínico envolvendo pacientes com histórico de infarto agudo no miocárdio. O tratamento com canakinumab, anticorpo anti-IL-1 β , possibilitou diminuição dos riscos cardiovasculares e das concentrações da proteína C reativa, um importante indicador inflamatório e intimamente relacionado as concentrações circulantes de IL-1 β e IL-6. (RIDKER *et al.*, 2017).

Nosso conjunto de dados sugeriu a importância do IL-1RI no aumento da PA promovida por ANGII. A ausência do receptor IL-1RI foi capaz de atenuar a PA durante 14 dias de infusão com ANGII por medida não invasiva. Porém, ao realizar medida invasiva da PA, a redução na PA não foi observada. O período de infusão de ANGII escolhido no presente trabalho foi de 14 dias. Os estudos mencionados abrangem um maior período de infusão com ANGII ou utilizam

de outro modelo animal crônico de HA, fato este que poderia justificar alterações mais acentuadas na PA.

As concentrações de IL-1 β estão aumentadas em modelos de HA por ANGII e em humanos (BIVOL *et al.*, 2008; DALEKOS *et al.*, 1997; REN *et al.*, 2017). Em especial, as concentrações circulantes de IL-1 β estão elevadas em pacientes com HA resistente em comparação a pacientes com HA e normotensos, e correlaciona-se com o aumento da rigidez arterial (BARBARO *et al.*, 2015). Além disso, PEETERS *et al.*, sugerem que o aumento das concentrações circulantes de IL-1Ra é um indicativo de uma resposta compensatória ao aumento da IL-1 β , quando a detecção é baixa na HA (PEETERS *et al.*, 2001). Ademais, a própria IL-1 β ao se ligar no IL-1RI é capaz de promover o aumento da sua própria expressão via NF κ -B, bem como dos componentes da sua ativação, pró-caspase 1 e NLRP3 (KRISHNAN *et al.*, 2014). Assim, no presente estudo as concentrações séricas de IL-1 β encontraram-se elevadas em camundongos WT infundidos com ANGII e não apresentaram diferença no grupo IL-1RI nocaute, bem como os respectivos grupos SHAM. Desta forma, o dado obtido corrobora com estudos mencionados, e indicou o aumento circulante e das ações da IL-1 β via IL-1RI na HA por ANGII.

A inovação deste estudo está na tentativa de esclarecer o papel do IL-1RI na DE e remodelamento vascular, uma vez que os estudos mencionados anteriormente abordaram somente as ações do IL-1RI ou IL-1 β em outros órgãos-alvos da HA. Nossos resultados mostraram que a resposta vasodilatadora dependente de endotélio foi afetada em animais WT e prevenida nos IL-1RI nocaute infundidos com ANGII.

De acordo com VALLEJO *et al.*, a curta incubação concentração-dependente de IL-1 β por duas horas em AMR resultou no aumento da produção de O⁻² pela NAD(P)H oxidase. Ao passo que a incubação dessas artérias em concentração-dependente com anakinra foi capaz de prevenir a geração de O⁻² e a DE, demonstrando a importância do IL-1RI nas ações mediadas pela IL-1 β . A incubação com tempol reverteu parcialmente a DE, enquanto a incubação com apocinina foi capaz de reverter completamente o prejuízo no relaxamento e o aumento na geração de O⁻² induzidos pela NAD(P)H. Embora, a concentração de nitrato esteja diminuída, e de iNOS e cicloxigenase (COX) estejam aumentadas em AMR incubadas com IL-1 β , a inibição de iNOS e COX, não foi capaz de reverter a DE (VALLEJO *et al.*, 2014).

Em paralelo a estes achados, as incubações de IL-1 β em AMR por longo período de tempo, promoveu aumento na geração de O⁻² via xantina oxidase e resultou em DE. A DE e a geração de EROs foi parcialmente prevenida por incubação prévia com SOD e alopurinol. Em

contrapartida, a incubação prévia com apocinina ou inibidor da iNOS não foi capaz de prevenir estes eventos. Porém, também foi observado uma DE nas AMR incubadas com IL-1 β , a qual foi prevenida pela adição dos agentes citados (JIMÉNEZ-ALTAYÓ *et al.*, 2006). Por outro lado, BRIONES *et al.* demonstram que o aumento de COX e iNOS por longo período de incubação com a IL-1 β contribuiu para DE em AMR de ratos idosos (BRIONES *et al.*, 2005).

Ao considerar o estresse oxidativo, a infusão de gevokizumab (anticorpo anti-IL-1 β) no núcleo paraventricular de ratos DSS, foi capaz de reduzir a PA e a FC, a expressão de NOX-2 e NOX-4, a produção de O²⁻, com normalização nas concentrações das citocinas IL-1 β e IL-10 no núcleo paraventricular (QI *et al.*, 2016). Além disso, em CMLV estimuladas simultaneamente com ANGII e IL-1 β foi observado sinergismo na atividade de NAD(P)H oxidase, expressão de NOX-1, produção de O²⁻ e aumento da migração e proliferação celular. (AGUADO *et al.*, 2015). Ao estimular AMR com IL-1 β ocorreu aumento na geração de O²⁻, ao passo que a incubação prévia com anakinra ou apocinina foi capaz de reverter esse estresse oxidativo (VALLEJO *et al.*, 2014). Na HA induzida por ANGII, WANG *et al.* demonstrou que o aumento na geração de O²⁻ em AMR está diretamente relacionado a DE sem alteração na resposta contrátil, ao passo que a incubação prévia com tempol previniu essas alterações (WANG *et al.*, 2006). Nosso estudo corrobora os achados na literatura e demonstrou maior produção de O²⁻ em AMR de camundongos WT infundidos com ANGII. Ao passo que os animais com ausência de IL-1RI foram capazes de atenuar o aumento na produção de O²⁻.

Em paralelo aos resultados de função vascular obtidos, os animais WT infundidos com ANGII apresentaram remodelamento eutrófico interno nas AMR, com aumento da parede vascular e AST inalterada. Entretanto, os animais com deleção do IL-1RI infundidos com ANGII não apresentaram diferença significativa nos parâmetros observados. De fato, o remodelamento vascular é considerado a primeira manifestação de lesão de órgãos-alvos na HA, seguido de DE e hipertrofia cardíaca (RENNALTA *et al.*, 2013). De acordo com a severidade da HA o tipo de remodelamento é alterado, na HA dependente de ANGII, o remodelamento eutrófico ou hipertrófico interno em AR é proeminente de acordo com a cronicidade do modelo (LI *et al.*, 2006; INTENGAN *et al.*, 2001). Em animais infundidos com ANGII, o remodelamento eutrófico interno foi evidenciado com o aumento da geração de O²⁻ em AMR, acompanhado de DE, eventos prevenidos com tratamento com apocinina (ZHOU *et al.*, 2005; VIRDIS *et al.*, 2004). Outros estudos também demonstraram o remodelamento do tipo eutrófico interno em modelo de infusão por ANGII (GRIFFIN *et al.*, 1991; DE CIUCEIS *et al.*, 2005). Ao considerar o remodelamento vascular, estudos abrangeram somente o NLRP3, que é o

responsável pelo processo de maturação da IL-1 β . REN & SUN, demonstram que camundongos nocautes para NLRP3 modelo SHR ou infundidos com ANGII, foram capazes de prevenir aumentos nas concentrações de IL-1 β , proliferação, transformação fenotípica e remodelamento vascular em aortas (REN *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017).

O aumento da inflamação crônica de baixo grau e citocinas inflamatórias na HA resulta em lesão em órgãos-alvos, incluindo a hipertrofia cardíaca. A decorrência dessas complicações cardiovasculares predispõe a arritmias, infarto agudo no miocárdio, insuficiência cardíaca (IC), entre outras, e são responsáveis por alta taxa de mortalidade. A hipertrofia cardíaca é um processo adaptativo do miocárdio frente a sobrecargas hemodinâmicas crônicas, decorrente basicamente do aumento da dimensão dos cardiomiócitos e proliferação do tecido conjuntivo (FRANCHINI, 2001). Em pacientes com hipertrofia do miocárdio ou IC, as concentrações de IL-1 β e IL-1Ra encontraram-se elevadas (VON HAEILING *et al.*, 2009). Em camundongos infundidos cronicamente com ANGII, o tratamento simultâneo com antagonista para IL-1RI e/ou para o receptor de TNF- α foi capaz de diminuir a infiltração de macrófagos, a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias e a fibrose cardiovascular (WANG *et al.*, 2014). Em outro modelo animal de infarto agudo do miocárdio, ocorreu melhora no remodelamento cardiovascular e apoptose de murinos tratados com anakinra ou com a super expressão de IL-1Ra (SUZUKI *et al.*, 2001; ABBATE *et al.*, 2008). Ao utilizar nocautes para IL-1RI, submetidos à isquemia e reperfusão, foi possível verificar diminuição do recrutamento de células do sistema imune, expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6, TNF- α e fibrose cardiovascular. Ao passo que os eventos de cicatrização foram aumentados com menor disposição ao remodelamento cardiovascular (BUJAK *et al.*, 2018). Em adição aos estudos em modelo animal, o tratamento com anakinra ou canakinumab foi capaz de diminuir a incidência de infarto agudo, eventos aterotrombóticos e resposta inflamatória em pacientes com histórico de infarto agudo no miocárdio (RIDCKER *et al.*, 2017; ABBATE *et al.*, 2015; BUCKLEY *et al.*, 2018).

Os estudos citados suportam o resultado encontrado no presente estudo, no qual os animais nocautes para IL-1RI foram prevenidos da hipertrofia dos cardiomiócitos na HA por ANGII. Assim, as evidências descritas sugerem o importante papel do IL-1RI em eventos que culminam em lesão cardiovascular induzida pela HA.

Em resumo, os resultados obtidos enfatizam a importância do IL-1RI na DE e remodelamento vascular, hipertrofia cardíaca e aumento do estresse oxidativo na HA induzida por ANGII. No qual, o estresse oxidativo pode ser um possível mecanismo para a prevenção

das alterações vasculares observadas nas AMR. Desta forma, este estudo possibilitou uma maior compreensão do papel da IL-1RI e dos mecanismos que controlam a função vascular de AR em condições hipertensivas. Assim, em adição aos achados na literatura, este estudo evidenciou a possibilidade do IL-1RI como um novo alvo terapêutico no tratamento da HA e danos cardiovasculares decorrentes.

Existem questões que poderiam ser abordadas para um maior entendimento dos mecanismos que medeiam os eventos vasculares observados. As etapas citadas a seguir serão realizadas em experimentos futuros. Os experimentos que serão realizados nos permitirão inferir sobre a relação direta das ações do IL-1RI com o estresse oxidativo desencadeando a DE e remodelamento vascular. No qual, os ensaios para determinar a expressão gênica e proteica do IL-1RI, IL-1 β , IL-1 α e das NOX1 e NOX4, nos permitirão analisar a relação do IL-1RI e citocinas no estresse oxidativo induzido pelas NOXs. Além de ensaios, para determinar a atividade da SOD, catalase e geração de H₂O₂. Em adição aos ensaios enzimáticos para determinação de citocinas, IL-1 α , IL-6, IL-17, IL-10, e do IL-1Ra, que nos permitiram determinar a contribuição do IL-1RI na concentração circulante dessas citocinas na HA por ANGII. Ao que concerne a prevenção da DE observada nos animais nocautes, incubações com inibidor seletivo da NOX, tiron e inibidor da catalase nos auxiliariam a elucidar o papel do estresse oxidativo na DE observada. Ademais, a determinação da atividade das MMP-2 e MMP-9 também representam mecanismos importantes que poderiam explicar a proteção dos animais IL-1RI ao remodelamento vascular na HA induzida por ANGII. No geral, entendemos que muitas perguntas carecem futuras elucidções, nos quais algumas serão alvos dos nossos próximos experimentos para uma compreensão melhor dos eventos.

Conclusão

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que o IL-1RI contribui para DE, remodelamento vascular e aumento do estresse oxidativo na HA induzida por ANGII.

Figura 10- Esquema representativo da conclusão do presente estudo.

Referências bibliográficas

8.0 Referências bibliográficas

1. ABBATE, A. et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 117, n. 20, p. 2670-2683, 2008.
2. ABBATE, A. et al. Comparative safety of interleukin-1 blockade with anakinra in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction (from the VCU-ART and VCU-ART2 pilot studies). **The American journal of cardiology**, v. 115, n. 3, p. 288-292, 2015.
3. ABDERRAZAK, A. et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. **Redox biology**, v. 4, p. 296-307, 2015.
4. AFONSO, F.M.; SICHIERI, R. Body mass index, waist hip ratio and hospitalizations in the city of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 2, p. 153-163, October, 2002
5. AGUADO, Andrea et al. HuR is required for NOX-1 but not NOX-4 regulation by inflammatory stimuli in vascular smooth muscle cells. **Journal of hypertension**, v. 34, n. 2, p. 253, 2016.
6. ANDERSON, T. J. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 34, n. 3, p. 631-638, 1999.
7. BARBARO, N. R et al. Increased arterial stiffness in resistant hypertension is associated with inflammatory biomarkers. **Blood pressure**, v. 24, n. 1, p. 7-13, 2015.
8. BIVOL, L. M.; et al.. Tetradecylthioacetic acid prevents the inflammatory response in two-kidney, one-clip hypertension. **American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 294, n. 2, p. R438-R447, 2008.
9. BLOCH, M. J. Worldwide prevalence of hypertension exceeds 1.3 billion. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 10, n. 10, p. 753-754, 2016.
10. BONFIM, G. F.; RODRIGUES, F. L.; CARNEIRO, F. S. Are the innate and adaptive immune systems setting hypertension on fire? **Pharmacological research**, 2017.
11. BRIONES, A.M, et al. Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1 β exposure in mesenteric resistance arteries. Mechanisms of ageing and development, v. 126, n. 6-7, p. 710-721, 2005.

12. BROUGH D., R. N.J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci.* 2007;120(5):772–781.
13. BROWN, I. AM et al. Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 9, p. 1969-1985, 2018.
14. BRUDER-NASCIMENTO, T, et al. NLRP3 Inflammasome Mediates Aldosterone-Induced Vascular DamageClinical Perspective. *Circulation*, v. 134, n. 23, p. 1866-1880, 2016.
15. BUCKLEY, L. F.; ABBATE, Antonio. Interleukin-1 blockade in cardiovascular diseases: a clinical update. *European heart journal*, v. 39, n. 22, p. 2063-2069, 2018.
16. BUJAK, M. et al. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *The American journal of pathology*, v. 173, n. 1, p. 57-67, 2008.
17. CAILLON, A.; SCHIFFRIN, E. L. Role of inflammation and immunity in hypertension: recent epidemiological, laboratory, and clinical evidence. **Current hypertension reports**, v. 18, n. 3, p. 1-9, 2016.
18. CROWLEY, S. D. et al. Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 298, n. 4, p. R1089-R1097, 2010.
19. DALEKOS, G. N. et al. Increased serum levels of interleukin-1 β in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 129, n. 3, p. 300-308, 1997.
20. DE CIUCEIS, C. et al. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II–infused macrophage colony-stimulating factor–deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 10, p. 2106-2113, 2005.
21. DI PAOLO, N. C.; SHAYAKHMETOV, Dmitry M. Interleukin 1 α and the inflammatory process. **Nature immunology**, v. 17, n. 8, p. 906, 2016.
22. DINARELLO, C. A. et al. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. **Frontiers in immunology**, v. 4, 2013.
23. DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, p. blood-2010-07-273417, 2011.

24. DINARELLO, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 20, n. 5; SUPP/27, p. S1-S13, 2002.
25. DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M. The role of interleukin-1 in disease. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 2, p. 106-113, 1993.
26. DRUMMOND, G. R.; SOBEY, C. G. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease?. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 9, p. 452-463, 2014.
27. EGAN, B.M. et al. Uncontrolled and apparent treatment resistant hypertension in the United States, 1988 to 2008. *Circulation*, p. **Circulation**. 111.030189, 2011.
28. ENGLAND, H. et al. Release of IL-1 α or IL-1 β depends on mechanism of cell death. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M114. 557561, 2014.
29. FERRONI, P. et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 16, n. 3, p. 222-233, 2006.
30. FLAMANT, M. et al. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 212-218, 2007.
31. FRAGOSO, J. M. et al. Interleukin 1 receptor antagonist polymorphisms are associated with the risk of developing acute coronary syndrome in Mexicans. **Immunology letters**, v. 133, n. 2, p. 106-111, 2010.
32. FRANCHINI, K. G. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 125-42, 2001.
33. GANTA, C. K. et al. Central angiotensin II-enhanced splenic cytokine gene expression is mediated by the sympathetic nervous system. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 4, p. H1683-H1691, 2005.
34. GARLANDA, C. et al. Decoys and regulatory “receptors” of the IL-1/Toll-like receptor superfamily. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 180, 2013.
35. GIUSTARINI D, et al. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Crit Rev Clin Lab Sci** 46(5-6):241-81, 2009.
36. GOMOLAK, J. R.; DIDION, Sean P. Angiotensin II-induced endothelial dysfunction is temporally linked with increases in interleukin-6 and vascular macrophage accumulation. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 396, 2014.
37. GRIFFIN, S. A. et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. **Hypertension**, v. 17, n. 5, p. 626-635, 1991.

38. GUZIK, T. J. et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II–induced hypertension and vascular dysfunction. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 10, p. 2449-2460, 2007.
39. HARRISON, D. G. The immune system in hypertension. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 125, p. 130, 2014.
40. HE, Y.; H., H.; N., G.. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 12, p. 1012-1021, 2016.
41. HONG, C. et al. Induction of ICE and inhibition of c-fos, jun D and zif 268 in 12-month old spontaneously hypertensive rats. *Life sciences*, v. 61, n. 2, p. A27-A31, 1997.
42. INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, v. 38, n. 3, p. 581-587, 2001.
43. JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F. et al. Increased superoxide anion production by interleukin-1 β impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 1, p. 42-52, 2006.
44. JUNG, O. et al. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation*, v. 109, n. 14, p. 1795-1801, 2004.
45. KITAMURA, K. et al. An Anti-Interleukin-1 β Antibody Suppresses Both Angiotensin II-induced Renal **Inflammation and Hypertension**. 2017.
46. KONUKOGLU, D.; UZUN, H. Endothelial dysfunction and hypertension. In: *Hypertension: from basic research to clinical practice*. Springer, Cham, 2016. p. 511-540
47. KRISHNAN, S. M. et al. IL-1 β and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension?. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 24, p. 5589-5602, 2014.
48. KRISHNAN, S. M. et al. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 4, p. 752-765, 2016.
49. KRISHNAN, S. M. et al. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage and dysfunction in salt-sensitive hypertension. **Cardiovascular Research**, 2018.
50. KUNNAS, T.; MÄÄTTÄ, K.; NIKKARI, S. T. NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome gene polymorphism rs7512998 (C> T) predicts aging-related increase of blood pressure, the TAMRISK study. **Immunity & Ageing**, v. 12, n. 1, p. 19, 2015.

51. LEE, J. et al. Differences in signaling pathways by IL-1 β and IL-18. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 23, p. 8815-8820, 2004.
52. LERMAN, A.; BURNETT, Jr JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*, v. 86, n. 6 Suppl, p. III12-19, 1992.
53. LI, J. S. et al. Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 271, n. 1, p. H88-H93, 1996.
54. LI, Jie et al. Reduction of NO-and EDHF-mediated vasodilatation in hypertension: role of asymmetric dimethylarginine. *Clinical and experimental hypertension*, v. 29, n. 7, p. 489-501, 2007.
55. LI, Q et al. Valsartan reduces interleukin-1 β secretion by peripheral blood mononuclear cells in patients with essential hypertension. **Clinica chimica acta**, v. 355, n. 1-2, p. 131-136, 2005.
56. LI, X., *et al.* The role of the inflammasome in cardiovascular diseases. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 4, p. 307-319, 2014.
57. LI, Yan et al. Study on the polymorphism of interleukin-1 gene and the susceptibility to essential hypertension. **Chinese journal of medical genetics**, v. 21, n. 5, p. 491-493, 2004.
58. LI, Yi-Shuan J.; HAGA, J. H.; CHIEN, S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. **Journal of biomechanics**, v. 38, n. 10, p. 1949-1971, 2005.
59. LIANG, K. C. et al. Interleukin-1 β induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor- κ B signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells. **Journal of cellular physiology**, v. 211, n. 3, p. 759-770, 2007.
60. LING, Y. H. et al. Anakinra reduces blood pressure and renal fibrosis in one kidney/DOCA/salt-induced hypertension. **Pharmacological research**, v. 116, p. 77-86, 2017.
61. LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
62. LUFT, F. C. et al. Hypertension-induced end-organ damage. **Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 212-218, 1999.
63. LUND-JOHANSEN, P. Haemodynamics in early essential hypertension--still an area of controversy. **Journal of hypertension**, v. 1, n. 3, p. 209, 1983.

64. MANGAN, M. SJ et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 8, p. 588, 2018.
65. MARVAR, Paul J. et al. Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension. **Circulation research**, v. 107, n. 2, p. 263-270, 2010.
66. MATSUNO, K. et al. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2677-2685, 2005.
67. MCMASTER, W. G. et al. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. **Circulation research**, v. 116, n. 6, p. 1022-1033, 2015.
68. MILLS, K. T. et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control Clinical Perspective. **Circulation**, v. 134, n. 6, p. 441-450, 2016.
69. MINSON, C. T.; GREEN, Daniel J. Measures of vascular reactivity: prognostic crystal ball or Pandora's box?. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, n. 2, p. 398-399, 2008.
70. MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, Rhian M. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 1, p. 164-182, 2014.
71. MONTEZANO, Augusto et al. 151 Nox5 induces vascular dysfunction and arterial remodelling independently of blood pressure elevation in ang ii-infused nox5-expressing mice. **Heart**, v. 103, n. Suppl 5, p. A111-A111, 2017.
72. MORI, Y. et al. Effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension research**, v. 29, n. 3, p. 187, 2006.
73. MULLER, Dominik N. et al. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. **The American journal of pathology**, v. 161, n. 5, p. 1679-1693, 2002.
74. MULVANY, Michael J. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? **Cardiovascular research**, v. 41, n. 1, p. 9-13, 1999.
75. ODENBACH, J. et al. MMP-2 Mediates Angiotensin II-Induced Hypertension Under the Transcriptional Control of MMP-7 and TACE. **Hypertension**, v. 57, n. 1, p. 123-130, 2011.
76. OLIVEIRA-PAULA, Gustavo; LACCHINI, Riccardo; E TANUS-SANTOS, Jose. Inducible nitric oxide synthase as a possible target in hypertension. **Current drug targets**, v. 15, n. 2, p. 164-174, 2014.

77. OMI, TOSHINORI et al. An intronic variable number of tandem repeat polymorphisms of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene modifies gene expression and is associated with essential hypertension. **European journal of human genetics**, v. 14, n. 12, p. 1295, 2006.
78. PACURARI, M. et al. The renin-angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. **International journal of inflammation**, v. 2014, 2014.
79. PEETERS, A. C. T. M. et al. Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. **European journal of clinical investigation**, v. 31, n. 1, p. 31-36, 2001.
80. POLENTARUTTI, N. et al. Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8\SIGIRR. *European cytokine network*, v. 14, n. 4, p. 211-218, 2003.
81. QI J, Z., *et al.* (2016). Targeting Interleukin-1 beta to Suppress Sympathoexcitation in Hypothalamic Paraventricular Nucleus in Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. *Cardiovasc Toxicol* **16**(3): 298-306.
82. RAJAGOPALAN, S. et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 8, p. 1916-1923, 1996.
83. RAY, R. et al. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 6, p. 1368-1376, 2011.
84. REN, X. et al. NLRP3 gene deletion attenuates angiotensin ii-induced phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells and vascular remodeling. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 2269-2280, 2017.
85. RENNA, N. F.; DE LAS HERAS, N.; MIATELLO, R. M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. **International journal of hypertension**, v. 2013, 2013.
86. RIDKER, P. M. et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 12, p. 1119-1131, 2017.
87. RUDEMILLER, Nathan P.; CROWLEY, Steven D. Interactions Between the Immune and the Renin–Angiotensin Systems in Hypertension. **Hypertension**, v. 68, n. 2, p. 289-296, 2016.
88. SCHIFFRIN, E. L. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. **Hypertension**, v. 19, n. Suppl II, p. 1-9, 1992.

89. SCHIFFRIN, E. L. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. 2004.
90. SCHRÖDER, K. et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. **Circulation research**, p. CIRCRESAHA. 112.267054, 2012.
91. SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-832, 2010.
92. SHAHAR et al. The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans. **Hypertension**, v. 51, n. 1, p. 127-133, 2008.
93. SOYLU, O. et al. Interleukin-1B (-511) gene polymorphism is associated with acute coronary syndrome in the Turkish population. **European cytokine network**, v. 19, n. 1, p. 42-48, 2008.
94. SUN, Hai-Jian et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to VSMC phenotypic transformation and proliferation in hypertension. **Cell death & disease**, v. 8, n. 10, p. e3074, 2017.
95. SUZUKI, K. et al. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. **Circulation**, v. 104, n. suppl 1, p. I-308-I-313, 2001.
96. TOUYZ, R. M. et al. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. **Molecular interventions**, v. 11, n. 1, p. 27, 2011.
97. TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 210-215, 2010.
98. VALLEJO, S. et al. The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovascular diabetology**, v. 13, n. 1, p. 158, 2014.
99. VIRDIS, A. et al. Role of NAD (P) H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. **Journal of hypertension**, v. 22, n. 3, p. 535-542, 2004.
100. WANG, D. et al. Angiotensin II infusion alters vascular function in mouse resistance vessels: Roles of O² and endothelium. **Journal of vascular research**, v. 43, n. 1, p. 109-119, 2006.
101. WANG, H. D. et al. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. **Circulation research**, v. 88, n. 9, p. 947-953, 2001.

102. WANG, Q. et al. Impact of NLRP3 inflammasome on the development of hypertension and renal and cardiac hypertrophy in 2K1C and DOCA/salt mice. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 31, n. 2, p. A83, 2012.
103. WANG, Q. et al. Renin-dependent hypertension in mice requires the NLRP3-inflammasome. *J Hypertens*, v. 3, n. 187, p. 2167-1095.10001, 2014.
104. WANG, Z. et al. Interleukin-1 β induces migration of rat arterial smooth muscle cells through a mechanism involving increased matrix metalloproteinase-2 activity. **Journal of Surgical Research**, v. 169, n. 2, p. 328-336, 2011.
105. WEBER, A.; WASILIEW, Peter; KRACHT, Michael. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Sci. Signal.**, v. 3, n. 105, p. cm1-cm1, 2010.
106. WEVER, Robert MF et al. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 97, n. 1, p. 108-112, 1998.
107. WHELTON, P. K. et al. Guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. **Hypertension**, 2017.
108. WU, R. F. al. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 14, p. 3553-3568, 2010.
109. YAXLEY, J. P.; THAMBAR, Sam V. Resistant hypertension: an approach to management in primary care. **Journal of family medicine and primary care**, v. 4, n. 2, p. 193, 2015.
110. ZAHRADKA, P. et al. NF- κ B activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 34, n. 12, p. 1609-1621, 2002.
111. ZHANG J, R. NP et al. Interleukin-1 Receptor Activation Potentiates Salt Reabsorption in Angiotensin II-Induced Hypertension via the NKCC2 Co-transporter in the Nephron. **Cell Metab** 23(2): 360-368.
112. ZHANG, Jiandong et al. Interleukin-1 augments salt retention in angiotensin II-induced hypertension via nitric oxide-dependent regulation of the NKCC2 sodium co-transporter. **Cell metabolism**, v. 23, n. 2, p. 360, 2016.
113. ZHAO, X. et al. Arterial pressure monitoring in mice. **Current protocols in mouse biology**, p. 105-122, 2011.

114. ZHOU, M-S.; JAIMES, Edgar A.; RAIJ, Leopoldo. Vascular but not cardiac remodeling is associated with superoxide production in angiotensin II hypertension. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 9, p. 1737-1743, 2005.

Anexos

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Contribuição da IL-1beta na disfunção e remodelamento vascular na hipertensão induzida por Angiotensina II*”, registrado com o número **179/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 28 de agosto de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 158 camundongos C57Bl 6 machos pesando 25g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e 158 camundongos IL-1Ra^{-/-} machos pesando 25g, oriundos do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 28/08/2017 a 15/03/2019.

We certify that the Protocol nº 179/2017, entitled “*Role of IL-1beta on vascular dysfunction and remodeling in angiotensin II-induced hypertension*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/28/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 158 male C57Bl 6 mice weighing 25g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo and 158 male IL-1Ra^{-/-} mice weighing 25g from the Animal House of the Department of Immunology of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 03/15/2019.

Ribeirão Preto, 28 de agosto de 2017

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