CINTHYA ECHEM DE SOUZA PEREIRA

PARTICIPAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL E DO RECEPTOR *TOLL-LIKE* 9 (TLR9) NA REATIVIDADE DE AORTAS DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) MACHOS E FÊMEAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

CINTHYA ECHEM DE SOUZA PEREIRA

PARTICIPAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL E DO RECEPTOR *TOLL-LIKE* 9 (TLR9) NA REATIVIDADE DE AORTAS DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) MACHOS E FÊMEAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pereira, Cinthya Echem de Souza
Participação do DNA mitocondrial e do receptor Toll-Like 9 (TLR9) na reatividade de aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos e fêmeas / Cinthya Echem de Souza Pereira; orientador Maria Helena Catelli de Carvalho. -- São Paulo, 2017.
96 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. DNA mitocondrial. 2. receptores Toll-Like 9. 3. hipertensão arterial. 4. machos e fêmeas SHR. I. Carvalho, Maria Helena Catelli de, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cinthya Echem de Souza Pereira

Título da Tese: Participação do DNA mitocondrial e do receptor *Toll-Like* 9 (TLR9) na reatividade de aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos e fêmeas

Orientador(a): Maria Helena Catelli de Carvalho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

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

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **145** nas fls. **95** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Helena Catelli de Carvalho, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Reatividade de macro e microvasos em patologias experimentais. Papel do endotélio** do qual participam o(s) alunos **Graziela Scalianti Ceravolo, Rosana Marangoni,Fernando Paranaiba Filgueira, Gisele Facholi Bomfim, Luciana dos Reis Rigueiral Giaquinto, Thiago Januário da Costa, Priscila Xavier de Araujo, Cynthia Echem de Souza Pereira, Murilo Lombardo Lopes Pereira,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **06.12.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 08 de dezembro de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA – ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 17/12/10
REL. Nº 5510

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 087.13

São Paulo, 31 de outubro de 2013.

REF.: Protocolo nº 145/10.

"*Reatividade de macro e microvasos em patologias experimentais. Papel do endotélio*"

Prezada Professora,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até 06.12.2016.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

P/ Bruno

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma. Sra.
Profa Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

EXPEDIÇÃO
DATA 14/11/13
REF. Nº 4143

Aos meus amores Suzan, Caio e Mauro
por todo amor, dedicação e companheirismo
obrigada por permitirem a realização desse sonho
sem vocês nada nessa trajetória teria sentido

As minhas queridas avó Wall e sogra Netina
meus exemplos de força e determinação
obrigada por todo amor e apoio sempre

A minha querida amiga Neusa da Fonseca
obrigada por cuidar do meu sorriso por mais de
20 anos, a sua partida deixa imensa saudade

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho por acreditar em meu potencial e sempre me incentivar a buscar o que há de melhor em mim. Obrigada por todo o tempo dedicado para a minha formação acadêmica, por todos os ensinamentos, por todos os conselhos e acima de tudo por permitir a realização deste sonho. Fui muito feliz durante todos esses anos ao lado da senhora e de sua equipe de pesquisa, a união e amizade que temos no laboratório são reflexo de sua personalidade e determinação, enfim, muito obrigada por me proporcionar um excelente ambiente de trabalho, isso fez toda a diferença.

À Dra. Eliana Hiromi Akamine por todo apoio e incentivo dados ao longo desses anos, por todos os ensinamentos, por todas as correções e pela paciência todos os dias. Obrigada pela amizade e pelos conselhos nos momentos mais necessários. A união e amizade que temos no laboratório são reflexo de como você encara a vida e cativa as pessoas.

À Dra. Zuleica Bruno Fortes por todo o suporte nessa trajetória, pelos ensinamentos, pelas críticas construtivas e fundamentais para a minha formação acadêmica. Obrigada por me permitir fazer parte de sua maravilhosa equipe.

Às Dras. Gisele Facholi Bomfim e Graziela Scalianti Ceravolo por todo apoio e ensinamentos no início da minha trajetória, pelos conselhos nos momentos mais necessários e pela amizade, sempre me lembrarei de vocês com imenso carinho.

Ao Dr. Richardt Gama Landgraf e Dra. Maristella de Almeida Vitta Landgraf, pela parceria e pelas contribuições fundamentais no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela amizade, pelas risadas e pelos momentos inesquecíveis.

Ao Dr. Stephen Fernandes de Paula Rodrigues e às Dras. Ana Paula Dantas e Maria do Carmo Franco, por suas contribuições no desenvolvimento deste trabalho, por todo apoio e incentivo.

Ao Dr. Luiz Jorge Fagundes, por acreditar em meu potencial e me abrir a primeira porta para a realização desse sonho.

Aos técnicos de laboratório e também amigos Maria Aparecida de Oliveira, Rosangela Eichler, Antônio Garcia, Sônia Leite, Marta Rodrigues, Sandra Silva, Manoel Rocha, Manoel Messias, Moacir Brito, Fabiane Fernandes, Ana Rita Araújo e Maria Alice Araújo, por todo suporte e ensinamentos ao longo desses anos, pela paciência, pela amizade, pelas infinitas risadas e por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos. Muito obrigada por serem pessoas tão incríveis, vou sempre me lembrar de cada um de vocês com imenso carinho.

Aos meus queridos amigos de laboratório Tiago Januário, Vanessa Oliveira, Simone Sartoretto, Bruno Marques, Andrea Prisco, Renée Oliveira, Carolina Midori, Aline Inada, Beatriz Costa, Lucas Giglio, Paula Barros, Aline Milan, Vanessa Miyoshi, Vanessa Franco, Beatriz Ponzio, Veronica Rennó, Eveline Fonseca, Priscila Xavier, Graziela Neves e Luciana Giaquinto, por todos os ensinamentos, apoio e incentivo sempre. Obrigada pela amizade, pelas infinitas risadas e por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos. Vocês são a minha família científica e toda essa trajetória só foi possível porque sempre tive pessoas muito especiais ao meu lado. A amizade e companheirismo de vocês tornaram essa trajetória muito mais fácil, vou sempre me lembrar de cada um de vocês com imenso carinho.

As secretárias e também amigas Camila Trindade, Mônica Nunes, Julieta Santos e Selma Rigonati, pelo auxílio com a papelada e com os prazos, pela amizade, pelo carinho, por todas as risadas e momentos inesquecíveis, vocês são incríveis.

À minha mãe Suzan Echem, meu irmão Caio César Echem e meu amor Mauro Terralavoro, por todo apoio e incentivo, pelo amor incondicional e por serem meus maiores fãs. Obrigada por vibrarem comigo à cada vitória, pelo aconchego de casa, pela inspiração, pela confiança e por serem meu chão e meu céu, sem vocês nada faria sentido.

Aos meus avós Walkyria Barbosa de Mello, Ruth Rosa Pereira (em memória) e Osvaldo de Souza Pereira, aos meus tios Wlademir Echem Júnior e Lia Mara Orlando e a minha cunhada Juliana Mascareti Desidério, por toda dedicação e incentivo constante. Obrigada por vibrarem comigo à cada vitória, por todo amor e pelos momentos maravilhosos em família.

À família Terralavoro, meus sogros Netina (em memória) e Renato, meus cunhados Renata e Steven, meus sobrinhos Luca e Elena, meus primos Karina, Denise e Marcos e meus tios Marisa, Ivany, Silvia e Reginaldo, por todo amor, pelo apoio e incentivo sempre. Obrigada por me adotarem na família, por serem sempre presentes e por vibrarem comigo à cada vitória.

Às minhas queridas amigas Débora Oliveira, Márcia Oliveira e Anelise Pavão, pelo presente da amizade, por todo o amor e companheirismo, pelas inúmeras risadas e pela certeza de que amigos também são irmãos.

À Universidade de São Paulo e às agências de fomento CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por incentivarem e permitirem a realização de trabalhos de pesquisa e a formação de diversos alunos.

Por fim, gostaria de agradecer à todos que direta ou indiretamente participaram não só no desenvolvimento deste trabalho, mas também que estiveram sempre presentes em minha vida, me apoiando, aconselhando e vibrando comigo cada nova vitória. Sou uma pessoa muito sortuda por ter pessoas tão especiais ao meu redor, obrigada à todos pela colaboração.

Eles não sabem que o sonho
é uma constante da vida
tão concreta e definida
como outra coisa qualquer,
como esta pedra cinzenta
em que me sento e descanso,
como este ribeiro manso
em serenos sobressaltos,
como estes pinheiros altos
que em verde e oiro se agitam,
como estas aves que gritam
em bebedeiras de azul.

eles não sabem que o sonho
é vinho, é espuma, é fermento,
bichinho álacre e sedento,
de focinho pontiagudo,
que fossa através de tudo
num perpétuo movimento.

Eles não sabem que o sonho
é tela, é cor, é pincel,
base, fuste, capitel,
arco em ogiva, vitral,
pináculo de catedral,
contraponto, sinfonia,
máscara grega, magia,
que é retorta de alquimista,
mapa do mundo distante,
rosa-dos-ventos, Infante,
caravela quinhentista,
que é cabo da Boa Esperança,
ouro, canela, marfim,
florete de espadachim,
bastidor, passo de dança,
Colombina e Arlequim,
passarola voadora,
pára-raios, locomotiva,
barco de proa festiva,
alto-forno, geradora,
cisão do átomo, radar,
ultra-som, televisão,
desembarque em foguetão
na superfície lunar.

Eles não sabem, nem sonham,
que o sonho comanda a vida,
que sempre que um homem sonha
o mundo pula e avança
como bola colorida
entre as mãos de uma criança.

Pedra Filosofal
Antônio Gedeão
Movimento Perpétuo, 1956

RESUMO

PEREIRA, C. E. S. **Participação do DNA mitocondrial e do receptor *Toll-Like* 9 (TLR9) na reatividade de aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos e fêmeas**. 2017. 96 f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

É bem estabelecido que a hipertensão arterial é maior em homens do que em mulheres em idade fértil. Na hipertensão arterial há inflamação crônica de baixa intensidade que pode modificar o seu próprio desenvolvimento e o de outras doenças cardiovasculares. A ativação da imunidade é fundamental para o desenvolvimento de processo inflamatório, portanto, trabalhos tem sido desenvolvidos para compreender a participação da imunidade, via receptores *Toll-Like* (TLRs), na inflamação presente na hipertensão arterial. Foi demonstrado que o TLR9 está envolvido no remodelamento cardíaco e na pré-eclâmpsia. Além disso, foi descrito que o DNA mitocondrial (DNAmit) é agonista endógeno do TLR9 e que sua principal fonte é a necrose celular, situação presente na hipertensão arterial. Portanto, sabendo-se que a hipertensão arterial é mais severa em machos do que em fêmeas, que os TLRs participam da hipertensão arterial e que a responsividade de alguns TLRs pode variar ao longo do ciclo menstrual, o objetivo desse trabalho foi avaliar a participação do DNAmit, via TLR9, na reatividade de aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos e fêmeas. Foram utilizados machos e fêmeas SHR e Wistar com 5 e/ou 15 semanas de idade. Demonstramos que o conteúdo de DNAmit no soro foi maior em machos SHR adultos (hipertensos) do que o de machos SHR jovens (pré-hipertensos) e o de machos Wistar adultos e jovens (normotensos). Os valores pressóricos e o conteúdo de DNAmit no soro de machos SHR adultos também foram maiores do que os de fêmeas SHR, diferença que não foi observada em ratos Wistar adultos. Portanto, os demais experimentos foram realizados apenas em SHR adultos. Em anéis de aorta isolados de machos e fêmeas SHR estudamos a incubação do DNAmit na reatividade vascular à acetilcolina, nitroprussiato de sódio, noradrenalina e fenilefrina, na expressão proteica de TLR9, MyD88, ERK1/2 e eNOS e na concentração de IL-6, TNF-α, IL-10 e EROs. Em aortas isoladas de machos SHR o DNAmit reduziu a sensibilidade ao nitroprussiato de sódio e aumentou a resposta máxima à fenilefrina (corrigido na presença de antagonista do TLR9), aumentou a expressão proteica da ERK1/2 e a incubação do DNAmit juntamente com a fenilefrina potencializou o aumento da ERK1/2 e aumentou a concentração de IL-6, TNF-α e IL-10. Em aortas isoladas de fêmeas SHR o DNAmit diminuiu a expressão proteica da ERK1/2, a concentração do TNF-α e o aumento de EROs induzido pela fenilefrina. Dessa forma, concluímos que o DNAmit modula de forma distinta a resposta vascular de machos e fêmeas SHR, o que poderia contribuir para a diferença sexual na hipertensão arterial. Podemos sugerir que o tratamento similar da hipertensão arterial para homens e mulheres deva ser reavaliado.

Palavras-chave: DNA mitocondrial. Receptores *Toll-Like* 9. Hipertensão arterial. Machos e fêmeas SHR.

ABSTRACT

PEREIRA, C. E. S. **Role of mitochondrial DNA and *Toll-Like* receptor 9 (TLR9) in the aorta reactivity of male and female spontaneously hypertensive rats (SHR).** 2017. 96 p. Ph. D. Thesis (Pharmacology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

It is well known that arterial hypertension is higher in men than in women at fertile age. There is a chronic low-grade inflammation in arterial hypertension which can modify its own development and the others cardiovascular diseases. Immunity activation is essential for the development of inflammatory process, therefore, studies have been developed to understand the role of immunity, through *Toll-Like* receptors (TLRs), in the inflammation present in arterial hypertension. It has been demonstrated that TLR9 is involved in cardiac remodeling and preeclampsia. In addition, it has been found that mitochondrial DNA (mtDNA) is an endogenous agonist of TLR9 and its main source is the cellular necrosis, which is present in arterial hypertension. Therefore, knowing that arterial hypertension is more severe in males than in females, and that TLRs play a role in arterial hypertension and also that the response of some TLRs may vary throughout the menstrual cycle, the aim of this study was to evaluate the role of mtDNA, through TLR9, in the aorta reactivity of male and female spontaneously hypertensive rats (SHR). Males and females SHR and Wistar rats with 5 and/or 15 weeks-old has been used. We have demonstrated that the content of serum mtDNA was higher in adults male SHR (hypertensive) than in young male SHR (pre-hypertensive) and in adults and young male Wistar rats (normotensive). Blood pressure values and content of serum mtDNA of male adults SHR were also higher when compared to the female SHR, a difference that was not observed in adults Wistar rats. Therefore, the following experiments were performed only in adults SHR. In aortic rings isolated from males and females SHR we studied the mtDNA incubation in vascular reactivity to acetylcholine, sodium nitroprusside, noradrenaline and phenylephrine, in protein expression of TLR9, MyD88, ERK1/2 and eNOS and in concentration of IL-6, TNF-α, IL-10 and ROS. In aortic rings isolated from male SHR the mtDNA reduced the sensitivity to sodium nitroprusside and increased the maximum response to phenylephrine (corrected in the presence of TLR9 antagonist), increased the ERK1/2 protein expression and the incubation of mtDNA plus phenylephrine potentiated the increase of ERK1/2 and increased the IL-6, TNF-α and IL-10 concentration. In aortic rings isolated from females SHR the mtDNA reduced the ERK1/2 protein expression, the TNF-α concentration and the increase in ROS induced by phenylephrine. Thus, we have conclude that mtDNA differently modulates the vascular response of males and females SHR which might contribute to the sexual difference in arterial hypertension. We might suggest that similar treatment of arterial hypertension for men and women might be reevaluated.

Keywords: Mitochondrial DNA. *Toll-Like* receptors 9. Arterial hypertension. Male and female SHR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Citocinas e resposta vascular.....26
Figura 2 – Ligantes dos receptores *Toll-Like*.....28
Figura 3 – Sinalização dos receptores *Toll-Like*.....29
Figura 4 – Sinalização canônica e não canônica do receptor *Toll-Like* 9.....32
Figura 5 – Ciclo estral por lavado vaginal.....37
Figura 6 – Protocolo experimental da reatividade vascular em aorta torácica.....42
Figura 7 – Expressão de NADH desidrogenase e citocromo B no soro de machos SHR e Wistar com 5 e 15 semanas de idade.....47
Figura 8 – Expressão de NADH desidrogenase e citocromo B no soro de machos e fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade.....48
Figura 9 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade.....50
Figura 10 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....51
Figura 11 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade.....53
Figura 12 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....54
Figura 13 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade.....56
Figura 14 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....57
Figura 15 – Efeito do DNA mitocondrial e ODN2088 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade.....59
Figura 16 – Efeito do DNA mitocondrial e ODN2088 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....60
Figura 17 – Expressão proteica do TLR9 e da molécula adaptadora MyD88 em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....62
Figura 18 – Expressão proteica da ERK1/2 fosforilada e total em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....64
Figura 19 – Expressão proteica da eNOS fosforilada e total em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....66
Figura 20 – Concentração de IL-6, TNF-α e IL-10 em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....68
Figura 21 – Detecção de EROs em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos para NADH desidrogenase, citocromo B, GAPDH e 16S ribossomal.....38
Tabela 2 – Valores de pressão arterial caudal de machos e fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade.....49
Tabela 3 – Resposta máxima e sensibilidade à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.....51
Tabela 4 – Resposta máxima e sensibilidade à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.....52
Tabela 5 – Resposta máxima e sensibilidade ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.....54
Tabela 6 – Resposta máxima e sensibilidade ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.....55
Tabela 7 – Resposta máxima e sensibilidade à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.....57
Tabela 8 – Resposta máxima e sensibilidade à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.....58
Tabela 9 – Resposta máxima à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial e ODN2088 (antagonista do TLR9).....60
Tabela 10 – Resposta máxima e sensibilidade à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial e ODN2088 (antagonista do TLR9).....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micrômetro
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
Ca^{2+}	Cálcio
$CaCl_2$-$2H_2O$	Cloreto de cálcio dihidratado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO_2	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CT	*Threshold cycle*
DAG	Diacilglicerol
DAMPs	Padrões moleculares associados à danos
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DHE	Diidroetidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmit	DNA mitocondrial
DNase	Enzima desoxirribonuclease
dsRNA	Ácido ribonucleico de fita dupla
DTPA	Acido dietilenotriaminopentacético
DTT	Ditiotreitol
EC	Célula endotelial
EC50	Concentração que induz metade da resposta máxima
EDTA-Na_2	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico

EGTA	Ácido tetra-acético de etileno glicol
eNOS	Óxido nítrico-sintase endotelial
epm	Erro padrão da média
ER	Retículo endoplasmático
ERK1/2	*Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET	Endotelina
ET-1	Endotelina 1
ET_A	Receptor de endotelinas tipo A
ET_B	Receptor de endotelinas tipo B
G	Força centrífuga
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HA	Ácido hialurônico
HSP60	Proteína do choque térmico 60
HSP70	Proteína do choque térmico 70
hTL8	Receptor *Toll-Like* 8 em humanos
ICAM	Molécula de adesão intercelular
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IP_3	Trifosfato de inositol
IRAK	I*nterleukin 1 receptor-associated kinase*
IRF	Fatores reguladores do interferon
IRF-1	Fator regulador 1 do interferon
IRF-3	Fator regulador 3 do interferon
IRF-5	Fator regulador 5 do interferon
IRF-7	Fator regulador 7 do interferon

KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
M	Molar
MAL/TIRAP	*MyD88-adaptor-like/TIR-associated protein*
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
mg	Miligrama
$MgSO_4$-$7H_2O$	Sulfato de magnésio heptahidratado
Mito	Mitocôndria
ml	Mililitro
MLCK	Quinase da cadeia leve da miosina
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
mTLR11	Receptor *Toll-Like* 11 em camundongos
MyD88	*Myeloid differentiation factor 88*
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa-B
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O_2^-	Ânion superóxido
O_2	Oxigênio
$ONOO^-$	Peroxinitrito
PAMP	Padrões moleculares associados à patógenos
PB	Tampão fosfato

PCR	Proteína C reativa
pg	Picograma
PGE_2	Prostaglandina E2
PGH_2	Prostaglandina H2
PGI_2	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase A
PLC	Fosfolipase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
Pré-pró ET	Pré-pró endotelina
PVDF	Fluoreto polivinidileno
Rmáx	Resposta máxima
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNase	Enzima ribonuclease
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real
SARM	*Sterile-α and heat/armadillo motif protein*
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERCA2	Cálcio adenosinatrifosfatase do retículo sarcoendoplasmático 2
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SMC	Célula do músculo liso vascular
SOD	Superóxido dismutase
SR	Retículo sarcoplasmático
ssRNA	Ácido ribonucleico de fita simples
tGPI-mucin	Glicoproteína de Trypanossoma cruzi ligante de mucina ancorada ao glicofosfatidilnositol
TIR	*Toll/Interleukin-1 receptor*
TIRAP	*TIR-associated protein*
TLR	Receptor *Toll-Like*
TLR1	Receptor *Toll-Like* 1
TLR2	Receptor *Toll-Like* 2
TLR3	Receptor *Toll-Like* 3
TLR4	Receptor *Toll-Like* 4

TLR5	Receptor *Toll-Like* 5
TLR6	Receptor *Toll-Like* 6
TLR7	Receptor *Toll-Like* 7
TLR8	Receptor *Toll-Like* 8
TLR9	Receptor *Toll-Like* 9
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TRAF6	T*umor necrosis factor-receptor-associated factor 6*;
TRAM	*Toll-receptor-associated molecule*
TRIF	*Toll-receptor-associated activator of interferon*
TXA_2	Tromboxano A2
UA	Unidades arbitrárias
USP	Universidade de São Paulo
VCAM	Molécula de adesão vascular
vs	Versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....21
1.1 Hipertensão Arterial.....21
1.2 Hipertensão Arterial e Inflamação.....24
1.3 Hipertensão Arterial e Receptores *Toll-Like*.....27
2 OBJETIVO.....35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....36
3.1 Animais.....36
3.2 Determinação do estro-fisiológico.....36
3.3 Quantificação do DNA mitocondrial no soro.....37
3.4 Pressão arterial caudal.....38
3.5 Extração do DNA mitocondrial do fígado.....39
3.6 Reatividade vascular em aorta torácica.....40
3.7 Expressão proteica pela técnica de Western Blotting.....42
3.8 Quantificação de citocinas pela técnica de Multiplex.....44
3.9 Detecção de espécies reativas de oxigênio pela técnica de Dihidroetidina...45
3.10 Análise estatística.....46
4 RESULTADOS.....47
4.1 Conteúdo de DNA mitocondrial no soro de machos SHR e Wistar com 5 e 15 semanas de idade.....47
4.2 Conteúdo de DNA mitocondrial no soro de machos e fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade.....48
4.3 Pressão arterial caudal de machos e fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade.....49
4.4 Resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....50
4.5 Resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....53
4.6 Resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....56
4.7 Resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....59
4.8 Expressão proteica do TLR9 e da molécula adaptadora MyD88 em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....62
4.9 Expressão proteica da ERK1/2 fosforilada e total em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....64
4.10 Expressão proteica da eNOS fosforilada e total em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....66
4.11 Concentração de IL-6, TNF-α e IL-10 em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....68
4.12 Detecção de EROs em aortas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.....71
5 DISCUSSÃO.....74
6 CONCLUSÃO.....86
REFERÊNCIAS.....87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial de alta prevalência caracterizada por valores elevados e sustentados de pressão arterial, com pressão diastólica maior ou igual a 90 mmHg e pressão sistólica maior ou igual a 140 mmHg (1, 2). Quando crônica, a hipertensão arterial está associada à alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, sendo considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (1).

De fato, a hipertensão arterial está presente em cerca de 69% dos pacientes com primeiro episódio de infarto agudo do miocárdio, 77% de acidente vascular encefálico, 75% com insuficiência cardíaca e 60% com doença arterial periférica, sendo responsável também por 45% das mortes cardíacas e 51% das mortes devido à acidente vascular encefálico (1).

No ano 2000, cerca de um quarto da população adulta, ou seja, aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo eram hipertensas e estima-se que até o ano de 2025 haverá cerca de 1,56 bilhão de adultos com hipertensão arterial (3). No Brasil, a hipertensão arterial acomete cerca de 36 milhões de adultos, contribuindo de forma direta ou indireta para cerca de 50% das mortes por doenças cardiovasculares. No Brasil, em 2013, 339.672 óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares, representando mais de 29% do total de óbitos e a principal causa de morte no país. Além disso, a hipertensão arterial está associada com um alto custo socioeconômico devido à alta frequência de internações e devido suas complicações terem grande impacto na perda da produtividade laboral e renda familiar (1).

É importante destacar que homens apresentam maior prevalência de hipertensão arterial e doenças cardiovasculares em comparação à mulheres em idade fértil, entretanto esta diferença iguala-se ou pode aumentar em mulheres na pós-menopausa em comparação aos homens de mesma idade (4), sugerindo uma ação protetora cardiovascular do estrógeno. Diferenças sexuais também são observadas em diversos modelos animais de hipertensão arterial, como em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), *stroke-prone* SHR, DOCA-sal, ratos Dahl-sal

sensíveis e animais hipertensos induzidos por infusão de angiotensina II ou aldosterona, cujos valores pressóricos são maiores em machos em comparação aos das fêmeas (5).

A ação protetora cardiovascular do estrógeno também foi demonstrada em animais SHR em trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa, uma vez que a remoção cirúrgica dos ovários (ovariectomia) e consequente redução na concentração endógena de estrógeno, promoveu aumento nos valores da pressão arterial e o tratamento hormonal os normalizou (6). Além disso, com o envelhecimento e redução na concentração endógena de estrógeno, fêmeas SHR com 18 meses de idade, apresentaram aumento da pressão arterial quando comparadas com a das fêmeas SHR jovens, semelhante ao que ocorre em mulheres na pós-menopausa (7).

A pressão arterial é uma variável física e produto do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. O débito cardíaco é dependente da frequência cardíaca e do volume sistólico, já a resistência vascular periférica é dependente da viscosidade do sangue, bem como do diâmetro e da capacidade contrátil das artérias e arteríolas (8), portanto, qualquer alteração em uma dessas variáveis pode interferir nos valores pressóricos.

A parede vascular é formada basicamente por três componentes estruturais, a túnica adventícia, a túnica média e a túnica íntima, sendo que a proporção entre essas camadas e o número de camadas presentes variam de acordo com o leito e a função vascular (9). A camada mais externa é a túnica adventícia que é composta principalmente por tecido conjuntivo, fibras colágenas e elásticas, possuindo função estrutural e nutridora dos vasos sanguíneos. A camada intermediária é a túnica média que é composta principalmente por células musculares lisas, fibras colágenas e elásticas em quantidade variável, possuindo papel fundamental no controle do tônus vascular, uma vez que as células do músculo liso vascular podem responder à agentes vasoconstritores e vasodilatadores. Já a camada mais interna é a túnica íntima que é composta principalmente por células endoteliais e tecido subendotelial (tecido conjuntivo frouxo e lâmina elástica interna) (8, 10).

As células endoteliais podem regular o tônus vascular, pois devido a sua localização, atuam como sensores de alterações hemodinâmicas, liberando diversas substâncias vasoativas, como os fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio (9). Dentre os fatores relaxantes derivados do endotélio, podemos citar o

óxido nítrico, a prostaciclina (PGI_2) e os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, que podem ser metabólitos do ácido araquidônico, derivados da enzima do citocromo P450 e endocanabinóides, dentre outros. Já dentre os fatores contráteis derivados do endotélio, podemos citar alguns prostanóides como o tromboxano A_2 (TXA_2) e a prontaglandina H_2 (PGH_2), endotelinas, angiotensina II e as espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (9).

Em condições fisiológicas há equilíbrio entre a produção e a liberação desses fatores, entretanto, em condições patológicas como na hipertensão arterial esse equilíbrio é alterado, levando à disfunção endotelial. Na hipertensão arterial, a disfunção endotelial está associada principalmente com redução no relaxamento dependente do endotélio, que pode ser devido a menor liberação e/ou efeito de fatores relaxantes derivados do endotélio, bem como maior liberação de fatores contráteis derivados do endotélio (9, 11). Além disso, a constante ativação e lesão endotelial podem acarretar em maior produção e liberação de moléculas pró-coagulantes, pró-trombóticas e pró-inflamatórias, favorecendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a aterosclerose (11, 12).

A disfunção endotelial está presente em diversos modelos experimentais de hipertensão arterial. Em SHR adultos o relaxamento dependente do endotélio está reduzido em artérias e arteríolas, bem como há aumento na produção de EROs e prostanóides vasoconstritores derivados da ciclooxigenase (COX), como a PGH_2 e TXA_2, com pouca ou nenhuma alteração na produção do óxido nítrico. Além disso, o aumento na produção de EROs como o ânion superóxido, reduz drasticamente a biodisponibilidade do óxido nítrico, favorecendo assim, o quadro de disfunção endotelial que é observado nesses animais (10, 13). As EROs podem também facilitar a mobilização de cálcio citosólico nas células do músculo liso vascular e aumentar a sensibilização dos elementos contráteis ao cálcio (9).

Por décadas, pesquisas envolvendo doenças cardiovasculares utilizavam principalmente machos como modelo experimental e extrapolavam os resultados para as fêmeas, entretanto, atualmente sabe-se que diferenças sexuais também são observadas em relação a função e disfunção endotelial (14). Foi demonstrado que anéis de aorta de fêmeas normotensas Wistar e hipertensas SHR apresentaram maior vasodilatação à acetilcolina, um vasodilatador dependente do endotélio, em comparação à dos machos (15). Nesses animais também foram observadas

diferenças sexuais associadas à agentes vasoconstritores, uma vez que anéis de aorta isolados de fêmeas hipertensas SHR apresentaram menor vasoconstrição à fenilefrina em comparação à dos machos (16).

Neste contexto, foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que a produção de EROs em arteríolas mesentéricas isoladas de machos SHR é maior do que a das fêmeas (17). Em coronárias de fêmeas normotensas Sprague-Dawley, foi observado maior concentração de cálcio intracelular em células endoteliais e maior atividade da óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) em comparação às dos machos (18).

Além disso, através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar que células endoteliais de veias umbilicais humanas provenientes de sexo masculino e feminino, apesar de não apresentarem diferenças sexuais em sua morfologia, apresentaram diferentes padrões ultraestruturais. As células endoteliais de veias umbilicais humanas provenientes de sexo masculino apresentaram vesículas pinocíticas distribuídas uniformemente na membrana celular, diversos vacúolos autofágicos e ausência de vacúolos lipídicos. Já as células endoteliais de veias umbilicais humanas provenientes de sexo feminino apresentaram vesículas pinocíticas distribuídas de forma aleatória na membrana celular, muitos lisossomos e vacúolos lipídicos, o que poderia contribuir para a diferença sexual encontrada em diversas respostas celulares (19).

Dessa forma, diversos estudos demonstraram que as diferenças sexuais associadas ao sistema cardiovascular vão além da prevalência das doenças cardiovasculares, abrangendo também alterações celulares e moleculares, o que torna essencial o desenvolvimento de pesquisas para compreender essas diferenças sexuais e assim promover estratégias terapêuticas diferenciadas e efetivas para homens e mulheres.

1.2 Hipertensão Arterial e Inflamação

Nos últimos anos vem sendo demonstrado que há forte relação entre doenças cardiovasculares e aumento de mediadores inflamatórios. Neste contexto, estudos epidemiológicos sugerem que o aumento nos níveis circulantes de algumas moléculas pró-inflamatórias como proteína C reativa (PCR), proteína amilóide A, interleucina 6 (IL-6) e molécula de adesão intercelular (ICAM) podem ser utilizadas como

marcadores de futuros eventos cardiovasculares, tais como doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e aterosclerose (20, 21).

De fato, as moléculas pró-inflamatórias estão envolvidas em todas as fases da aterosclerose, possuindo grande influência na patogênese dessa doença. Na fase inicial da aterosclerose há disfunção endotelial e maior expressão de moléculas pró-inflamatórias que alteram a permeabilidade da célula endotelial, estimulam o recrutamento de leucócitos, a migração e a proliferação de células do músculo liso vascular, entretanto, o processo inflamatório crônico induz em última instância a desestabilização e ruptura da placa aterosclerótica. Algumas citocinas como interferon gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina 1 beta (IL-1β) podem promover apoptose de macrófagos e células do músculo liso vascular e inibir a síntese de componentes de estabilização da placa, o que aumenta sua vulnerabilidade e o risco de desenvolvimento de doença vascular trombótica (20, 22).

O processo inflamatório pode contribuir também para o desenvolvimento e progressão de outras doenças cardiovasculares. Histologicamente, o aneurisma de aorta abdominal apresenta lesões nas camadas adventícia e média vascular, com grande infiltração de células que secretam diversas moléculas inflamatórias como citocinas e leucotrienos, bem como EROs, o que induz o remodelamento da matriz extracelular e apoptose de células do músculo liso vascular (20, 23).

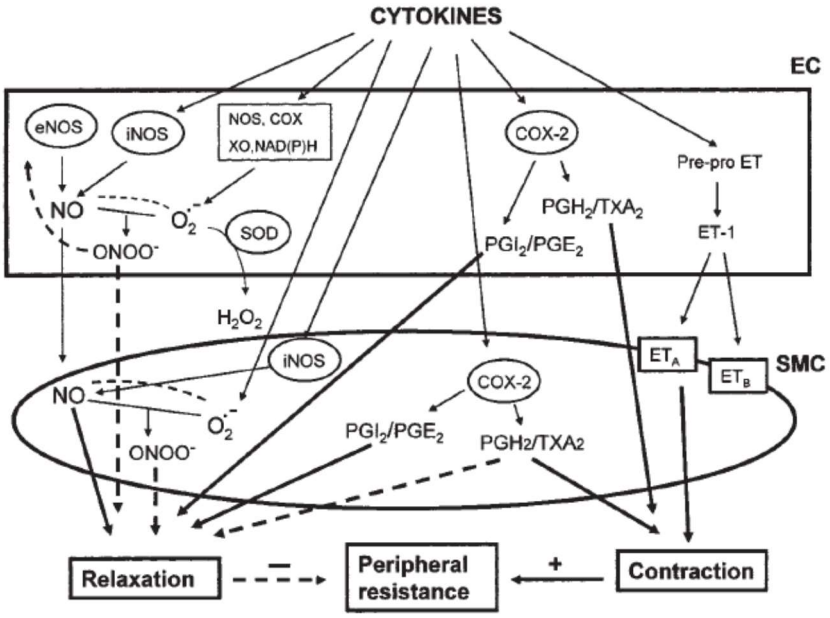
Autores observaram também que há correlação positiva entre inflamação e insuficiência cardíaca, pois quanto maior os valores de moléculas pró-inflamatórias circulantes como PCR e TNF-α, maior o grau de insuficiência cardíaca em humanos (24-26). Citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão como IL-6, interleucina 8 (IL-8) e molécula de adesão vascular (VCAM-1) também podem estar envolvidas na insuficiência valvar observada em varizes, pois essas moléculas podem estimular a infiltração de células inflamatórias, hipertrofia e fibrose da parede venosa e a degradação de proteínas da matriz extracelular, o que afetaria a integridade estrutural da parede venular e acarretaria em insuficiência venosa progressiva (20, 27).

No que se refere à hipertensão arterial, também tem sido demonstrado que há forte relação com a inflamação. De fato, trabalhos envolvendo pacientes e animais hipertensos SHR demonstraram que estes possuem concentrações plasmáticas aumentadas de algumas moléculas pró-inflamatórias como PCR, TNF-α, IL-6, IL-1β, VCAM-1, ICAM-1, proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), angiotensina II,

proteínas do choque térmico 60 (HSP60) e 70 (HSP70), maior ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-κB) e maior produção de EROs, dentre outras (20, 28-34). Apesar disso, ainda não se sabe se a hipertensão arterial por lesionar diversos órgãos-alvo induz à inflamação crônica, ou se a inflamação crônica por causar alterações estruturais e funcionais na parede vascular acarreta em hipertensão arterial.

É bem estabelecido que as citocinas podem influenciar a resposta vascular, uma vez que podem induzir a expressão de genes que sintetizam diversos mediadores como prostanóides, leucotrienos, bradicinina, óxido nítrico e EROs, bem como diversas enzimas como a COX2 e a óxido nítrico-sintase induzível (iNOS). Todos esses mediadores podem induzir uma resposta vascular que dependerá do equilíbrio entre os fatores vasoativos liberados, do leito vascular e do tempo de exposição às citocinas (Figura 1) (35, 36).

Figura 1 – Citocinas e resposta vascular.



COX: ciclooxigenase; COX-2: ciclooxigenase 2; EC: célula endotelial; eNOS: óxido nítrico-sintase endotelial; ET-1: endotelina 1; ET_A: receptor de endotelinas tipo A; ET_B: receptor de endotelinas tipo B; H_2O_2: peróxido de hidrogênio; iNOS: óxido nítrico-sintase induzível; NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; O_2^-: ânion superóxido; $ONOO^-$: peroxinitrito; PGE_2: prostaglandina E2; PGH_2: prostaglandina H2; PGI_2: prostaciclina; Pre-pro ET: pré-pró endotelina; SMC: célula do músculo liso vascular; SOD: superóxido dismutase; TXA_2: tromboxano A2. Fonte: (35).

Neste contexto, autores demonstraram que ratos Sprague-Dawley injetados com PCR por 3 dias apresentaram redução da vasodilatação induzida por acetilcolina em arteríolas mesentéricas e redução na expressão e atividade da eNOS, bem como aumento na produção de EROs em aorta abdominal (37). Em células endoteliais de veias umbilicais humanas incubadas com PCR, resultados semelhantes foram observados, com redução na expressão da eNOS e consequente redução na produção de óxido nítrico (38). Um dos principais estímulos para a produção de PCR é o aumento na concentração de IL-6 uma citocina que em hepatócitos age estimulando a produção de proteínas de fase aguda (39).

Em cultura de células endoteliais de aorta bovina, a incubação com TNF-α e IL-1β aumentou a concentração de ET-1, um potente vasoconstritor (40). Autores observaram também que a infusão de TNF-α está associada com vasoconstrição coronariana e aumento plasmático de ET-1 em ratos Wistar, vasoconstrição brônquica em ovelhas via liberação de ET-1 e vasoconstrição renal com redução na filtração glomerular por aumento de ânion superóxido e consequente redução de óxido nítrico em camundongos C57BL/6 (41-43).

Em condições fisiológicas, a resposta inflamatória inicial visa remover células mortas e restos de matriz, além de reparar danos teciduais através da fibrogênese ou regeneração tecidual, restaurando as estruturas e funções originais dos órgãos e tecidos. Apesar disso, a resposta inflamatória crônica pode induzir deposição de matriz extracelular, crescimento de tecido granular e conectivo, bem como a síntese de diversas substâncias vasoativas, o que pode ser deletério para os órgãos e/ou tecidos afetados (44, 45).

É importante destacar que a ativação do sistema imunológico gera processo inflamatório perante uma lesão, sendo assim, estudos tem sido desenvolvidos com o objetivo de investigar a participação do sistema imunológico em diversas doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial.

1.3 Hipertensão Arterial e Receptores *Toll-Like*

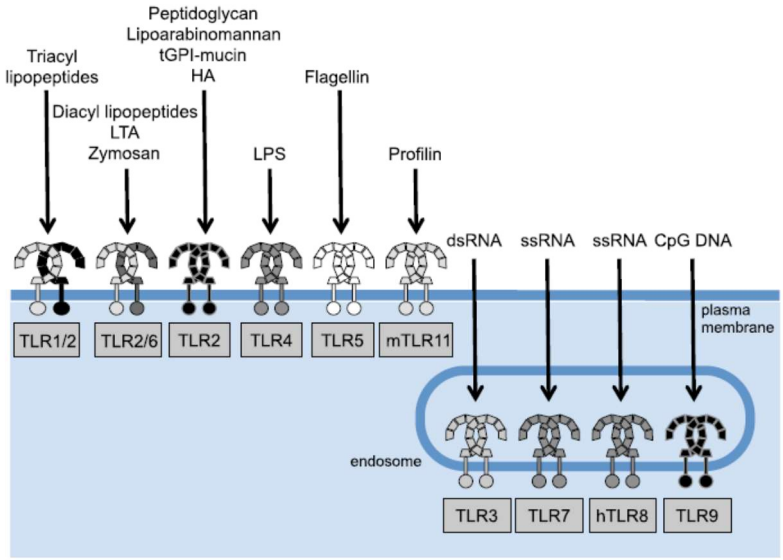
Os receptores *Toll-Like* (TLRs) são uma família de receptores de reconhecimento de padrões expressos em células imunológicas (inata e adquirida) e não imunológicas, como células endoteliais e células do músculo liso vascular (46-

48). Já foram identificados 10 subtipos de TLRs em humanos (TLRs 1-10) e 13 subtipos em ratos e camundongos (TLRs 1-13) (49).

Inicialmente os TLRs foram identificados como receptores capazes de reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), provenientes de vírus, bactérias ou fungos, porém, atualmente sabe-se que esses receptores também são capazes de reconhecer padrões moleculares associados à danos (DAMPs), podendo ser ativados por moléculas provenientes do próprio hospedeiro mesmo na ausência de agentes patogênicos (49).

Os TLRs são glicoproteínas transmembrana, compostas por um domínio extracitosólico rico em repetições de leucina que permitem a ligação com uma grande variedade de ligantes, um único domínio transmembrana que determina a sua localização celular e um domínio citosólico chamado TIR (Toll/Interleukin-1 receptor) que permite a ligação de moléculas adaptadoras e a ativação da subjacente sinalização. Os subtipos TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 encontram-se localizados na membrana plasmática, enquanto que os subtipos TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 encontram-se principalmente na membrana endossomal (Figura 2) (50).

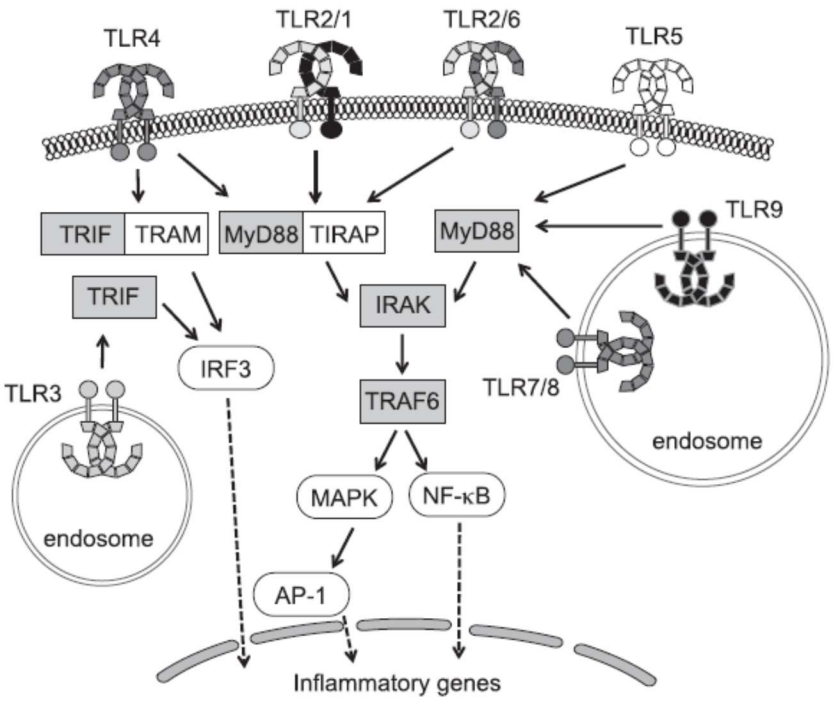
Figura 2 – Ligantes dos receptores *Toll-Like*.



CpG: citosina-fosfato-guanina; DNA: ácido desoxirribonucleico; dsRNA: ácido ribonucleico de fita dupla; HA: ácido hialurônico; hTL8: receptor *Toll-Like* 8 em humanos; LPS: lipopolissacarídeo; LTA: ácido lipoteicóico; mTLR11: receptor *Toll-Like* 11 em camundongos; ssRNA: ácido ribonucleico de fita simples; tGPI-mucin: glicoproteína de Trypanossoma cruzi ligante de mucina ancorada ao glicofosfatidilnositol; TLR1: receptores *Toll-Like* 1; TLR2: receptores *Toll-Like* 2; TLR3: receptores *Toll-Like* 3; TLR4: receptores *Toll-Like* 4; TLR5: receptores *Toll-Like* 5; TLR6: receptores *Toll-Like* 6; TLR7: receptores *Toll-Like* 7; TLR9: receptores *Toll-Like* 9. Fonte: (50).

Já foram identificadas cinco moléculas adaptadoras associadas a sinalização dos TLRs, a MyD88 (myeloid differentiation factor 88), MAL/TIRAP (MyD88-adaptor-like/TIR-associated protein), TRIF (Toll-receptor-associated activator of interferon), TRAM (Toll-receptor-associated molecule) e SARM (sterile-α and heat/armadillo motif protein), sendo que essas proteínas estão envolvidas em duas principais sinalizações, uma dependente da ativação de MyD88 e uma dependente da ativação de TRIF (Figura 3) (49, 50).

Figura 3 – Sinalização dos receptores *Toll-Like*.



AP-1: proteína ativadora-1; IRAK: *interleukin 1 receptor-associated kinase*; IRF3: fator regulador 3 do interferon; MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos; MyD88: *myeloid differentiation factor 88*; NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa-B; TIRAP: *TIR-associated protein*; TLR1: receptores *Toll-Like* 1; TLR2: receptores *Toll-Like* 2; TLR3: receptores *Toll-Like* 3; TLR4: receptores *Toll-Like* 4; TLR5: receptores *Toll-Like* 5; TLR6: receptores *Toll-Like* 6; TLR7: receptores *Toll-Like* 7; TLR8: receptores *Toll-Like* 8; TLR9: receptores *Toll-Like* 9; TRAF6: *tumor necrosis factor-receptor-associated factor 6*; TRAM: *Toll-receptor-associated molecule*; TRIF: *Toll-receptor-associated activator of interferon*. Fonte: (50).

A molécula adaptadora MyD88 pode se ligar diretamente ao domínio citosólico dos TLR5, TLR7, TLR8 e TLR9, enquanto que para a sinalização dos TLR2 e TLR4 a MyD88 é recrutada para o domínio TIR via ação da MAL/TIRAP. A ativação da sinalização via MyD88 induz a ativação do NF-κB, MAPKs e alguns fatores

reguladores de interferon (IRF) como IRF-1, IRF-5 e IRF-7, induzindo a síntese de diversas moléculas pró-inflamatórias. Já a molécula adaptadora TRIF pode se ligar diretamente ao domínio citosólico do TLR3, enquanto que para a sinalização TLR4 a TRIF é recrutada para o domínio TIR via ação da TRAM. A sinalização via TRIF também induz a ativação do NF-κB e IRF-3, levando a síntese de diversas moléculas pró-inflamatórias (Figura 3) (46, 50).

Como descrito anteriormente, os TLRs também são ativados por alguns DAMPs provenientes do próprio hospedeiro, podendo essas moléculas serem constitutivas ou induzidas, bem como secretadas por células mortas ou danificadas após uma lesão (51). Neste contexto, já foi descrito que na hipertensão arterial há aumento de algumas moléculas endógenas como PCR, angiotensina II, HSP60, HSP70, IL-1α, proteína amiloide A, fibrinogênio, lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada, ácido hialurônico e ácido úrico, que podem agir como DAMPs e ativar os TLRs (52-61), gerando um quadro inflamatório crônico que poderia contribuir para as alterações vasculares presentes na hipertensão arterial. Este poderia ser um dos elos entre hipertensão arterial, inflamação e ativação do sistema imunológico.

Sabe-se que a própria hipertensão arterial pode alterar a expressão dos TLRs. De fato, recentemente demonstramos de forma pioneira que o conteúdo de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) do TLR4 em arteríolas mesentéricas, coração e rins eram maiores em machos hipertensos SHR com 15 semanas de idade, quando comparados aos dos SHR em fase pré-hipertensiva com 5 semanas de idade, indicando que o desenvolvimento da hipertensão arterial pode estar associado ao aumento na expressão dos TLRs (62).

Além disso, demonstramos também que a expressão proteica do TLR4 em arteríolas mesentéricas e ventrículo esquerdo era maior em machos hipertensos SHR em comparação a dos controles normotensos Wistar. Verificamos também que nos machos SHR adultos o antagonismo do TLR4 com anticorpo anti-TLR4, está associado com redução da resposta máxima à noradrenalina em arteríolas mesentéricas de resistência, redução do remodelamento cardíaco em ventrículo esquerdo, bem como redução de moléculas inflamatórias e da sinalização do TLR4, demonstrando a participação direta do TLR4 na hipertensão arterial e alterações associadas (31, 63, 64).

É importante destacar que já foi descrito que a ativação dos TLRs pode variar ao longo do ciclo menstrual em células do sangue total de mulheres, sugerindo uma ativação diferencial desses receptores de acordo com a concentração de estrógeno e progesterona (65). Na clínica, já foi descrito que o polimorfismo do TLR4 (Asp299Gly) em mulheres hipertensas está associado a menor massa e menor espessura da parede ventricular esquerda em comparação às das mulheres que não apresentaram o polimorfismo. Entretanto, a presença do polimorfismo em homens hipertensos não altera a massa ventricular (66), sugerindo uma possível diferença sexual na ativação destes receptores.

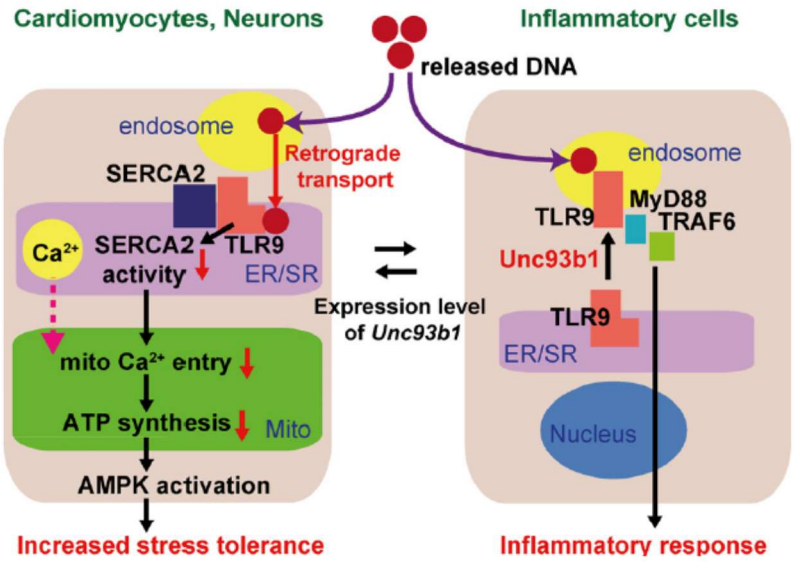
Além dos TLR4, outros TLRs também já foram descritos como sendo capazes de afetar o sistema cardiovascular. Como exemplo, autores observaram que camundongos *knockout* para TLR9 apresentaram menor frequência cardíaca basal, maior entropia cardíaca total e maior função do baroreflexo quando comparados à camundongos *wild-type* (67).

O TLR9 reconhece sequências ricas em CpG (citosina-fosfato-guanina) não metiladas de DNA (ácido desoxirribonucleico) encontradas principalmente no DNA bacteriano, mitocondrial e fetal, entretanto, sabe-se que esses receptores também são capazes de reconhecer o DNA do vírus da herpes e a hemozoína, um subproduto gerado pelo *Plasmodium falciparum*, um protozoário que causa malária (50). Os TLR9 ficam localizados principalmente na membrana do retículo endoplasmático e na presença de CpG DNA translocam-se para os endossomos via ação da proteína Unc93b1, onde iniciam sua sinalização via MyD88 e induzem a produção de diversas moléculas pró-inflamatórias (68).

Recentemente foi descrito que em células não imunológicas como cardiomiócitos e neurônios, mesmo após estímulo, o TLR9 permanece no retículo endoplasmático e por transporte retrógrado o CpG DNA é transportado para o retículo endoplasmático onde ativará o TLR9 e induzirá uma resposta celular protetora. Essa resposta celular está associada com redução na atividade da SERCA2 (cálcio adenosinatrifosfatase do retículo sarcoendoplasmático 2), redução do transporte de cálcio entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria e redução da síntese de adenosina trifosfato (ATP), levando à ativação da AMPK (proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina - AMP), redução do metabolismo energético e maior tolerância ao estresse celular (69, 70).

Portanto, em células imunológicas a ativação do TLR9 está associada com a indução de processo inflamatório via MyD88, enquanto que em células não imunológicas a ativação do TLR9 está associada com a indução de maior tolerância ao estresse celular, o que ocorre de maneira independente de MyD88 e é denominado de via não-canônica do TLR9 (Figura 4) (70).

Figura 4 – Sinalização canônica e não canônica do receptor *Toll-Like* 9.



AMPK: proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina; ATP: adenosina trifosfato; Ca^{2+}: cálcio; DNA: ácido desoxirribonucleico; ER: retículo endoplasmático; Mito: mitocôndria; MyD88: *myeloid differentiation factor 88*; SERCA2: cálcio adenosinatrifosfatase do retículo sarcoendoplasmático 2; SR: retículo sarcoplasmático; TLR9: receptor *Toll-Like* 9; TRAF6: *tumor necrosis factor-receptor-associated factor 6*. Fonte: (70).

Além do CpG DNA bacteriano e fetal, o DNA mitocondrial (DNAmit) também tem sido descrito como DAMP e ligante endógeno do TLR9 devido a sua similaridade ao DNA bacteriano, uma vez que, segundo a teoria endossimbiótica as mitocôndrias evoluíram de bactérias até se tornarem organelas intracelulares, portanto, as mitocôndrias guardam algumas características de seus ancestrais bacterianos, contendo por exemplo sequências de CpG não metiladas em seu DNA e podendo assim, agir como agonista endógeno do TLR9 (71, 72).

As mitocôndrias são responsáveis por diversos processos celulares, incluindo produção de ATP, produção de calor e morte celular por apoptose e necrose (73, 74). Diferentemente da apoptose onde a membrana plasmática permanece intacta e o

conteúdo celular é rapidamente eliminado por fagocitose, na necrose ocorre ruptura da membrana plasmática e consequente extravasamento de todo o conteúdo celular, extravasando inclusive o DNAmit e sendo essa umas das principais fontes de DNAmit livre circulante (72, 73, 75).

A presença de necrose celular já foi descrita em diversas doenças cardiovasculares como pré-eclâmpsia, infarto do miocárdio, aterosclerose, acidente vascular encefálico e insuficiência cardíaca, bem como em diversas alterações cardiovasculares associadas à hipertensão arterial, como a hipertrofia e a fibrose cardíacas (76-82).

O aumento de EROs e citocinas pró-inflamatórias também podem induzir necrose celular. Já foi descrito aumento de necrose em cardiomiócitos de ratos tratados com isoproterenol, bem como em cultura de células de neuroblastoma incubadas com peróxido de hidrogênio (83, 84). Além disso, o aumento exacerbado de EROs pode induzir células apoptóticas a tornarem-se necróticas, fato associado a inibição de caspases e a depleção rápida nos níveis de ATP (84-86). Houve também aumento de necrose e apoptose em cultura de células pancreáticas de ratos Sprague-Dawley incubadas com TNF-α e IL-1β, sendo que a presença de necrose foi mais proeminente em comparação com a apoptose celular (87).

Tendo em vista que a necrose é umas das principais fontes de DNAmit circulante e que na hipertensão arterial e condições associadas há grande quantidade de células em necrose, é possível sugerir que nessas condições ocorra também aumento na concentração de DNAmit circulante. De fato, foi demonstrado que há aumento de DNAmit no soro de mulheres com pré-eclâmpsia em comparação com as gestantes que não possuíam pré-eclâmpsia (88). Foi demonstrado também que quanto maior a concentração de DNAmit circulante maior o risco de deslocamento da placenta e nascimento prematuro (89).

Em fêmeas prenhes Wistar, a administração de DNAmit e ODN2395 (agonista sintético do TLR9) induziu aumento da pressão arterial sistólica, aumento da expressão proteica do TLR9 e da MAPK ERK1/2 em arteríolas mesentéricas, bem como a prole apresentou baixo peso ao nascer (90). A administração de ODN2395 também induziu aumento da pressão arterial sistólica, aumento da vasoconstrição induzida por U46619 (mimético do TXA_2), maior geração de EROs e da expressão

proteica da COX2 em arteríolas mesentéricas em fêmeas prenhes Sprague-Dawley em comparação com as fêmeas controle (91).

Em pacientes hipertensos, autores demonstraram que o conteúdo de DNA plasmático rico em CpG era maior em comparação ao dos pacientes normotensos, entretanto, neste trabalho não foi verificado se esse DNA era mitocondrial. Tendo em vista o aumento de CpG DNA em pacientes hipertensos, os autores imunizaram animais SHR com 2 dias de vida com injeção subcutânea de CpG-DNA humano, com o objetivo de estimular a produção de anticorpos anti-CpG DNA. Foi demonstrado que a imunização causou retardo no aumento da pressão arterial dos animais imunizados em comparação aos que receberam salina (92).

Em resumo, sabe-se que na hipertensão arterial há processo inflamatório crônico de baixa intensidade que pode modificar diretamente o seu desenvolvimento e progressão e o de outras doenças cardiovasculares. Além disso, a ativação do sistema imunológico é fundamental para o desenvolvimento de processo inflamatório perante uma lesão, sendo assim, a ativação dos TLRs torna-se um elo importante entre hipertensão arterial e inflamação.

Sabe-se também que há diferença sexual associada a hipertensão arterial e que a ativação dos TLRs pode ser influenciada por alterações hormonais, uma vez que a responsividade desses receptores pode variar ao longo do ciclo menstrual. Portanto, embora muitos trabalhos busquem compreender a participação dos TLRs na hipertensão arterial e em outras doenças cardiovasculares, ainda é desconhecido se a ativação desses receptores pode contribuir para a diferença sexual presente na hipertensão arterial.

2 OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi avaliar a participação do DNA mitocondrial, via receptores *Toll-Like* 9, na reatividade de aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos e fêmeas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos Wistar machos com 5 e 15 semanas de idade e fêmeas com 15 semanas de idade, provenientes do Biotério de Produção de Ratos (Instituto de Ciências Biomédicas, Rede Universidade de São Paulo). Os ratos foram mantidos durante todo o período experimental no Biotério do Departamento de Farmacologia – Unidade I, em caixas de polipropileno (quatro animais por caixa) em ambiente com temperatura controlada (24 ± 2 ºC) e ciclo claro-escuro (12 horas / 12 horas), com livre acesso à água e alimento.

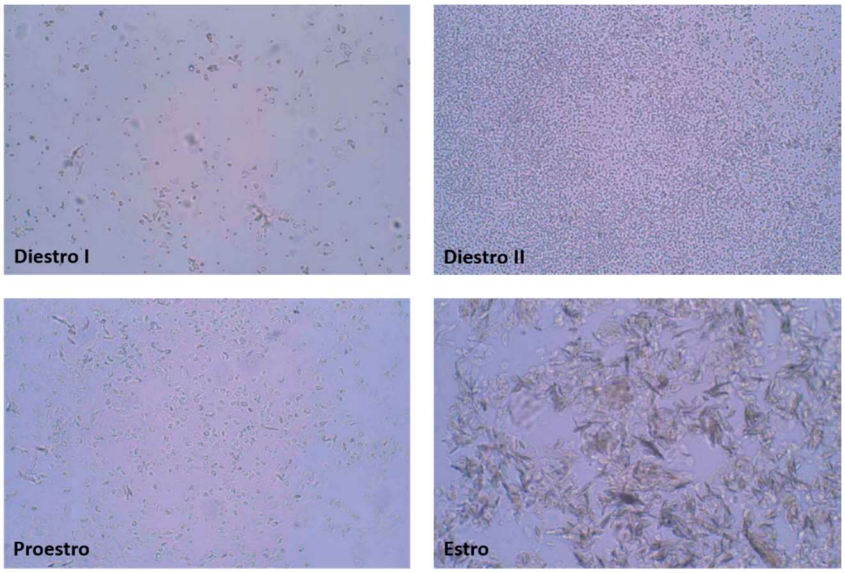
Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), sob o número 145, folha 95, livro 2 aprovado em 06/12/2010 (autorização renovada em 31/10/2013) e sob o número 134/2016 aprovado em 22/11/2016.

3.2 Determinação do estro-fisiológico

Foi realizada a coleta de material vaginal de fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade para a determinação do ciclo-estral. As coletas foram realizadas sempre no mesmo horário e antes da realização dos protocolos experimentais.

Para esse procedimento, foi utilizada pipeta e ponteira contendo cerca de 30 µl de solução estéril de salina 0,9%. A ponta da ponteira foi introduzida no orifício vaginal das ratas e a solução salina injetada, aspirada e colocada em lâmina de vidro para observação em microscópio óptico. O exame celular desta secreção permitiu diferenciar as fases do ciclo-estral (Figura 5). As ratas foram utilizadas no período de estro, fase com predominância de células cornificadas que apresentam aspecto de “folhas secas” (93).

Figura 5 – Ciclo estral por lavado vaginal



Fotomicrografia ótica com as diferentes fases do ciclo estral de ratas Wistar (diestro I, diestro II, proestro e estro). Fonte: Adaptado de (93).

3.3 Quantificação do DNA mitocondrial no soro

O DNAmit livre foi quantificado no soro de machos e fêmeas SHR e Wistar com 5 e/ou 15 semanas de idade. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg/intraperitoneal, Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil), cerca de 5 ml do sangue total foi coletado pela aorta abdominal, acondicionado em tubo plástico estéril e centrifugado a 4000 G à 4 ºC por 15 minutos.

À partir do soro, o DNA desses animais foi isolado utilizando o QIAamp DNA Blood Mini kit (51104, Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as normas descritas pelo fabricante. Após o isolamento do DNA, a determinação da concentração das amostras foi realizada por espectrofotometria em 260 nm utilizando aparelho NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Para os ensaios de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real) foram utilizados 5 ng de DNAmit de cada amostra com os oligonucleotídeos para NADH desidrogenase e citocromo B (presentes apenas no DNAmit), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - presente no DNA

genômico e utilizado para detectar a pureza da extração do DNAmit) e o RNA ribossomal bacteriano 16S (para averiguar contaminação bacteriana) (Tabela1).

Para a reação de RT-PCR foi utilizado o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) que contém Syber Green (corante com afinidade para DNA de fita dupla). A reação foi realizada sob as seguintes condições: 2 minutos à 95 °C, seguido por 40 ciclos à 95 °C por 15 segundos e à 60 °C por 1 minuto. A especificidade da reação foi confirmada pela análise da curva de dissociação utilizando como base a temperatura de dissociação (*melting point*).

A quantificação foi feita baseada no cálculo do $2^{\Delta Ct}$ à partir do Ct (ciclo limiar – "*threshold cycle*") obtido para NADH desidrogenase e citocromo B. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos para NADH desidrogenase, citocromo B, GAPDH e 16S ribossomal.

	SENSE	**ANTI-SENSE**
NADH desidrogenase	CAATACCCCACCCCCTTATC	GAGGCTCATCCCGATCATAG
citocromo B	TCCACTTCATCCTCCCATTC	CTGCGTCGGAGTTTAATCCT
GAPDH	GGGCAGCCCAGAACATCAT	CCGTTCAGCTCTGGGATGAC
16S ribossomal	AACAGGATTAGATACCCTGGTAG	GGTTCTTCGCGTTGCATC

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

3.4 Pressão arterial caudal

Foi aferida a pressão arterial caudal de machos e fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade. É importante ressaltar que antes do protocolo experimental todos os animais foram submetidos à adaptação para excluir possíveis interferências no procedimento.

A pressão arterial foi determinada por método indireto de pletismografia de cauda, onde um oclusor e um sensor de pulso foram colocados na porção proximal da cauda dos ratos e acoplados ao esfigmomanômetro conectado ao sistema de transdução de sinal PowerLab/4S (ADInstruments, Nova Gales do Sul, Austrália).

Os animais foram aquecidos por 10 minutos à 40 ºC e colocados em cilindro de contenção com abertura para cauda e focinho. O valor final da pressão arterial caudal de cada animal representa a média de cinco medidas sequenciais e foi expressa em milímetros de mercúrio (mmHg).

3.5 Extração do DNA mitocondrial do fígado

As mitocôndrias foram isoladas dos fígados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg/intraperitoneal, Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil) e após laparotomia os fígados foram coletados, acondicionados em tubos estéreis do tipo Falcon e mantidos congelados à -20 ºC até a data do processamento.

Para a extração do DNAmit, os fígados foram processados em tampão gelado (contendo 250 mM de sacarose, 10 nM de hepes e 1 mM de EGTA diluídos em água ultrapura Milli-Q® - pH 7,2) em homogeneizador tipo “Potter” e centrifugados a 600 G à 4 ºC por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 12000 G à 4 ºC por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet lavado no mesmo tampão e centrifugado novamente a 12000 G à 4 ºC por 10 minutos.

O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspendido em 500 µl de tampão gelado (contendo 250 mM de sacarose e 10 nM de hepes diluídos em água ultrapura Milli-Q® - pH 7,2). Foi adicionado mesmo volume de tampão de lise (Buffer AL – 19075, Qiagen, Hilden, Alemanha) e 10 µl de proteinase K (19131, Qiagen, Hilden, Alemanha) e mantidos à 56 ºC por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado mesmo volume de fenol (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1, P3803, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), incubado por 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 13000 rpm à 4 ºC por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo, foi adicionado mesmo volume de solução contendo etanol/acetato (concentração 19:1 – álcool etílico 100% e acetato de sódio 3 M pH 5,2 – diluídos em água ultrapura Milli-Q®) e centrifugado a 13000 rpm à 4 ºC por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, ao pellet foi adicionado álcool 70% diluído em água ultrapura Milli-Q® e centrifugado novamente a 13000 rpm à 4 ºC por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e após secagem do pellet,

o mesmo foi ressuspendido em cerca de 1 ml de água DEPC (água tratada com dietil pirocarbonato – livre de RNAses, DNAses e resíduos de proteínas).

Após a extração do DNAmit, a determinação da concentração das amostras foi realizada por espectrofotometria em 260 nm utilizando aparelho NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Para confirmação da pureza do DNAmit extraído, foram realizados ensaios de RT-PCR utilizando 5 ng de DNAmit de cada amostra com os oligonucleotídeos para NADH desidrogenase e citocromo B (presentes apenas no DNAmit), GAPDH (presente no DNA genômico e utilizado para detectar a pureza da extração do DNAmit) e RNA ribossomal bacteriano 16S (para averiguar qualquer contaminação bacteriana) (Tabela1).

Para a reação de RT-PCR foi utilizado o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) que contém Syber Green (corante com afinidade para DNA de fita dupla). A reação foi realizada sob as seguintes condições: 2 minutos à 95 °C seguido por 40 ciclos à 95 °C por 15 segundos e à 60 °C por 1 minuto. A especificidade da reação foi confirmada pela análise da curva de dissociação utilizando como base a temperatura de dissociação (*melting point*).

3.6 Reatividade vascular em aorta torácica

Foi realizada a reatividade vascular em anéis de aorta torácica com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade. Para esse estudo, foi utilizada a aorta torácica isolada, conforme técnica inicialmente descrita por Carvalho et al. (94). Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg/intraperitoneal, Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil) e após toracotomia as aortas foram removidas, dissecadas e imersas em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificado (130 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,6 mM de $CaCl_2$-$2H_2O$, 1,17 mM de $MgSO_4$-$7H_2O$, 1,18 mM de KH_2PO_4, 14,9 mM de $NaHCO_3$, 26 µM de EDTA-Na_2 e 5,5 mM de glicose, diluídos em água destilada - pH 7.4).

As aortas foram cortadas em anéis de 4 mm e o endotélio vascular foi mantido intacto. Em seguida, um par de ganchos de aço inoxidável em forma de “L” foi introduzido no lúmen dos anéis e montados na cuba de vidro para estudo de órgãos isolados contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit modificado saturado com 95% de O_2 e 5% de CO_2 à 37 ºC durante todo o protocolo experimental.

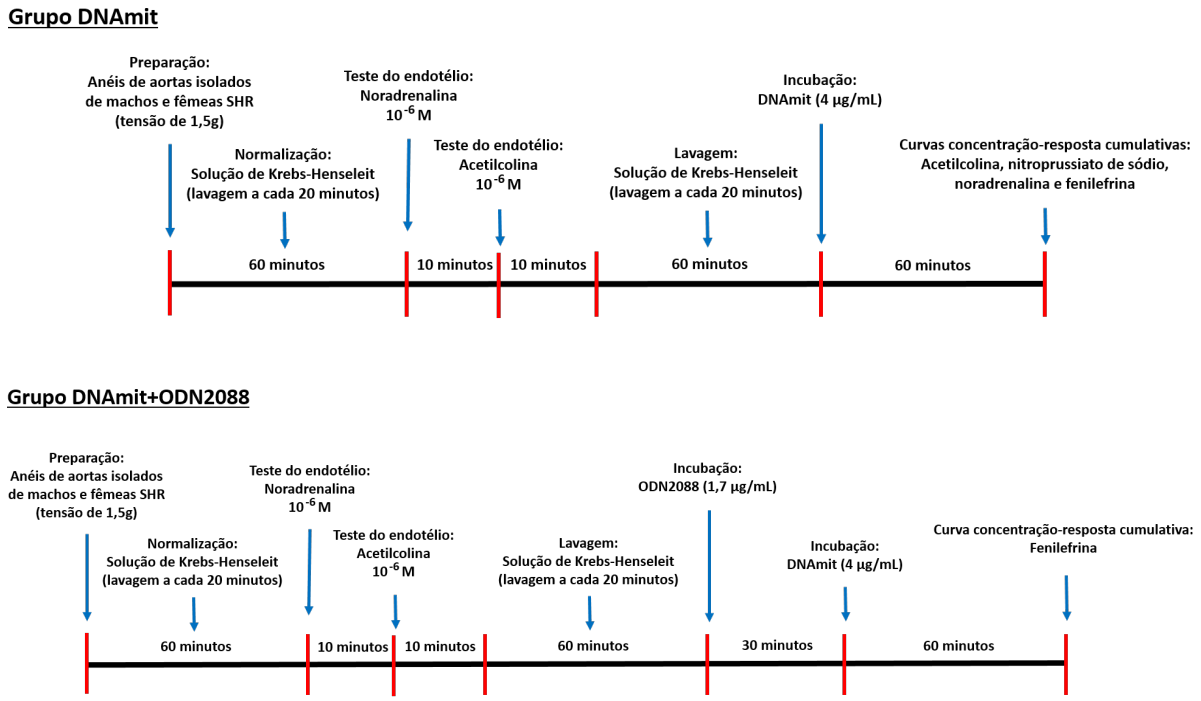
Nessa condição, um dos ganchos foi fixado na base da cuba e o outro gancho conectado a um transdutor para tensão isométrica (ML T001, PanLab, Barcelona, Espanha) conectado ao sistema de aquisição de dados (PowerLab/8S, ADInstruments, Nova Gales do Sul, Austrália) que estava acoplado a um computador. Essas preparações foram mantidas por 60 minutos sob tensão inicial de 1,5 grama e durante o período de estabilização a solução nutriente foi trocada três vezes em intervalos de vinte minutos, sendo a tensão ajustada após cada lavagem.

Para confirmar a presença do endotélio vascular, os anéis foram pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M, concentração capaz de produzir de 60 à 80% da resposta máxima) e então o agente vasodilatador dependente do endotélio acetilcolina (10^{-6} M) foi aplicado. O endotélio foi considerado intacto quando o relaxamento foi superior a 60%. Após esse procedimento, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para os agentes vasodilatadores acetilcolina (10^{-9} a 10^{-5} M, vasodilatador dependente do endotélio) e nitroprussiato de sódio (10^{-9} a 10^{-5} M, doador de óxido nítrico) em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M).

Em outra série de experimentos, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas para os agente vasoconstritores noradrenalina (10^{-10} a 10^{-4} M, agonista adrenérgico não seletivo) e fenilefrina (10^{-10} a 10^{-4} M, agonista adrenérgico α-1 seletivo). Após a estabilização, alguns anéis foram pré-incubados com DNAmit (4 µg/ml) extraído dos fígados de machos ou fêmeas SHR, por 1 hora antes do início das curvas. Outros anéis foram incubados com antagonista do TLR9 ODN2088 (1,7 µg/ml, tlrl-2088-1, InvivoGen, Califórnia, Estados Unidos), por 30 minutos antes da incubação com DNAmit (as doses utilizadas foram previamente definidas em ensaios de cultura de células do músculo liso vascular de arteríolas mesentéricas isoladas de machos Wistar e SHR – dados não apresentados) (Figura 6).

Os resultados foram expressos como porcentagem (%) de relaxamento à pré-contração induzida pela noradrenalina ou em gramas (g) de tensão. Para comparação entre os grupos experimentais, foi avaliada a resposta máxima (Rmáx) e a sensibilidade (pD2 = logarítimo da concentração molar que produz 50% da Rmáx – EC50) das preparações aos agonistas.

Figura 6 – Protocolo experimental da reatividade vascular em aorta torácica



DNAmit: DNA mitocondrial; SHR: ratos espontaneamente hipertensos.

3.7 Expressão proteica pela técnica de Western Blotting

Foram avaliadas as expressões proteicas do TLR9, da molécula adaptadora MyD88, da ERK1/2 (fosforilada e total) e da eNOS (fosforilada e total) em aortas torácicas com endotélio isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg/intraperitoneal, Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil) e após toracotomia as aortas foram removidas, dissecadas e incubadas individualmente em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificado (130 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,6 mM de $CaCl_2$-$2H_2O$, 1,17 mM de $MgSO_4$-$7H_2O$, 1,18 mM de KH_2PO_4, 14,9 mM de $NaHCO_3$, 26 µM de EDTA-Na_2 e 5,5 mM de glicose, diluídos em água destilada - pH 7.4, saturado com 95% de O_2 e 5% de CO_2) por 1 hora à 37 °C (grupo controle).

Algumas aortas foram estimulas com DNAmit (4 µg/ml) extraído do fígado de machos ou fêmeas SHR, por 1 hora à 37 °C em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificado (a dose utilizada foi previamente definida em ensaios de cultura de células

do músculo liso vascular de arteríolas mesentéricas isoladas de machos Wistar e SHR – dados não apresentados). Após o período de 1 hora, algumas aortas receberam estímulo adicional de fenilefrina (10^{-5} M) por 15 minutos (dose e tempo previamente definidos em ensaio de Dihidroetidina em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR – dados não apresentados). As aortas foram então rapidamente congeladas e mantidas à -80 °C até a data do processamento.

As aortas foram pulverizadas em gral e pistilo de porcelana, homogeneizadas e incubadas por 30 minutos em 30 µl de tampão de lise gelado contendo 10% de RIPA Lysis Buffer 10 x (20-188, Merk Millipore, Massachusetts, Estados Unidos), 90% de água destilada, 1 mM de PMSF, 10 mM de ortovanadato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de pirofosfato de sódio e 0,2% de inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos).

Os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 G à 4 °C por 30 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e utilizado para quantificação do conteúdo proteico total, utilizando o método de BCA (ácido bicinconínico, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Posteriormente, as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (1:1, #1610737, Bio-Rad, São Paulo, Brasil) contendo DTT (ditiotreitol, 350 mM) e aquecidas à 99 °C em termobloco por 5 minutos.

Foram utilizados 50 µg de proteína de cada amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida em aparelho para mini gel (BioRad, Califórnia, Estados Unidos) à 100 volts. A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para membranas de PVDF (fluoreto polivinidileno) utilizando aparelho para transferência (BioRad, Califórnia, Estados Unidos) durante 1 hora e 30 minutos à 100 volts. As membranas foram incubadas com solução bloqueadora (albumina bovina 3% diluída em solução tampão TBS-T – pH 7,6 contendo 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl e 0,1% Tween 20, diluído em água destilada) em temperatura ambiente por 2 horas para reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos nas membranas.

As membranas foram então incubadas individualmente com os diferentes anticorpos primários: anti-TLR9 (1:500, ab12121, Abcam), anti-MyD88 (1:200, sc11356, SantaCruz), anti-ERK1/2 fosforilada (1:1000, #9101S, Cell Signaling), anti-ERK1/2 total (1:1000, #9102S, Cell Signaling), anti-eNOS fosforilada Ser1177 (1000, #9571, Cell Signaling), anti-eNOS total (1:1000, #9572, Cell Signaling) e anti-α-actina

(1:20000, 032M4822, Sigma-Aldrich) diluídos em solução bloqueadora 3%, por 16 horas à 4 °C. Após, as membranas foram lavadas três vezes de 10 minutos com solução tampão (TBS-T) em temperatura ambiente e incubadas com os anticorpos secundários: anti-rabbit (1:2000 e 1:4000, 111-035-144, Jackson ImmunoResearch) ou anti-mouse (1:6000 e 1:40000, 115-035-166, Jackson ImmunoResearch) também diluídos em solução bloqueadora 3%, por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente.

O procedimento de lavagem foi repetido novamente e as membranas incubadas com solução quimioluminescente (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). A quimioluminescência foi detectada em aparelho Carestream Molecular Imaging (Gel Logic 2200 PRO, Carestream Health, Nova York, Estados Unidos) e a intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização do programa ImageJ Launcher (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos). A normalização das amostras foi realizada utilizando-se a α-actina e os valores expressos em UA.

3.8 Quantificação de citocinas pela técnica de Multiplex

A concentração de citocinas IL-6, TNF-α e IL-10 foi avaliada em aortas torácicas com endotélio isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg/intraperitoneal, Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil) e após toracotomia as aortas foram removidas, dissecadas e incubadas individualmente em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificado (130 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,6 mM de $CaCl_2$-$2H_2O$, 1,17 mM de $MgSO_4$-$7H_2O$, 1,18 mM de KH_2PO_4, 14,9 mM de $NaHCO_3$, 26 μM de EDTA-Na_2 e 5,5 mM de glicose, diluídos em água destilada – pH 7.4, saturado com 95% de O_2 e 5% de CO_2) por 1 hora à 37 °C (grupo controle).

Algumas aortas foram estimulas com DNAmit (4 μg/ml) extraído do fígado de machos ou fêmeas SHR, por 1 hora à 37 °C em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificado (a dose utilizada foi previamente definida em ensaios de cultura de células do músculo liso vascular de arteríolas mesentéricas isoladas de machos Wistar e SHR – dados não apresentados). Após o período de 1 hora, algumas aortas receberam

estímulo adicional de fenilefrina (10^{-5} M) por 15 minutos (dose e tempo previamente definidos em ensaio de Dihidroetidina em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR – dados não apresentados). As aortas foram então rapidamente congeladas e mantidas à -80 °C até a data do processamento.

As aortas foram pulverizadas em gral e pistilo de porcelana, homogeneizadas e incubadas por 30 minutos em 50 µl de tampão de lise gelado contendo 10% de RIPA Lysis Buffer 10 x (20-188, Merk Millipore, Massachusetts, Estados Unidos), 90% de água destilada, 1 mM de PMSF, 10 mM de ortovanadato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de pirofosfato de sódio e 0,2% de inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos). Os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 g à 4 °C por 30 minutos para a remoção do material insolúvel.

Posteriormente, o sobrenadante foi removido e utilizado para quantificação do conteúdo proteico total por espectrofotometria em 560 nm, utilizando o método de BCA (ácido bicinconínico, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). À partir do conteúdo proteico total, foi avaliada a concentração de citocinas utilizando kit específico e de acordo com as normas descritas pelo fabricante (MILLIPLEX MAP Rat Cytokines/Chemokine - Merk Millipore, Massachusetts, Estados Unidos). Os valores obtidos foram normalizados pelo conteúdo proteico total de cada amostra e expressos como picograma por micrograma (pg/µg).

3.9 Detecção de espécies reativas de oxigênio pela técnica de Dihidroetidina

A produção de superóxido foi detectada em aortas torácicas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg/intraperitoneal, Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil) e após toracotomia as aortas torácicas foram removidas, dissecadas e incubadas individualmente em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificado (130 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,6 mM de $CaCl_2$-$2H_2O$, 1,17 mM de $MgSO_4$-$7H_2O$, 1,18 mM de KH_2PO_4, 14,9 mM de $NaHCO_3$, 26 µM de EDTA-Na_2 e 5,5 mM de glicose, diluídos em água destilada – pH 7.4, saturado com 95% de O_2 e 5% de CO_2) por 1 hora à 37 °C (grupo controle).

Algumas aortas foram estimulas com DNAmit (4 µg/ml) extraído do fígado de machos ou fêmeas SHR, por 1 hora à 37 °C em solução nutriente de Krebs-Henseleit

modificado (a dose utilizada foi previamente definida em ensaios de cultura de células do músculo liso vascular de arteríolas mesentéricas isoladas de machos Wistar e SHR – dados não apresentados). Após o período de 1 hora, algumas aortas receberam estímulo adicional de fenilefrina (10^{-5} M) por 15 minutos (dose e tempo previamente definidos em ensaio de Dihidroetidina em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR – dados não apresentados). As aortas foram embebidas em meio para congelamento (Tissue-Tek® O.C.T., Saku-4583, Sakura Finetek, Califórnia, Estados Unidos), congeladas e mantidas à temperatura de -80 °C até a data do processamento.

Em criostato à -25 °C (Leica CM 1850, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) foram realizados cortes transversais (10 µm) e os mesmos foram acomodados em lâminas contendo poli-L-lisina. Os cortes foram circundados com caneta hidrofóbica e incubados à 37 °C em câmara úmida por 10 minutos com tampão fosfato (PB 0,1 M – pH 7,4). O tampão fosfato foi removido e os cortes incubados à 37 °C em estufa protegida da luz por 60 minutos com 100 µl de solução de dihidroetidina (DHE 5 µM) contendo DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético 100 µM).

Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Instruments, Nova York, Estados Unidos) equipado com filtro para rodoamina e câmera fotográfica digital, utilizando lente objetiva e filtro para fluorescência. Foi observada a geração de EROs em quatro áreas diferentes de três cortes, observando a integridade das camadas de músculo liso vascular e a marcação nuclear das células. A intensidade de fluorescência das imagens foi quantificada utilizando o programa ImageJ Launcher (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos) e normalizadas pelo tamanho da área analisada. Os valores de densidade óptica foram expressos em UA.

3.10 Análise estatística

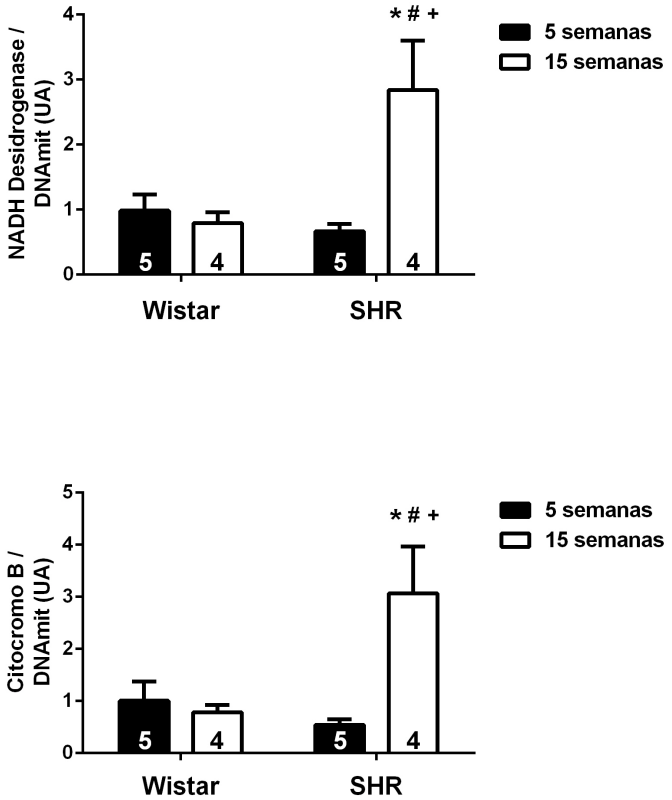
Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (epm). As análises foram realizadas no Programa Prisma versão 6 utilizando o teste "*t-Student*" não pareado ou a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido de teste de múltiplas comparações Tukey. O nível de significância adotado em nosso estudo foi de $p<0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Conteúdo de DNA mitocondrial no soro de machos SHR e Wistar com 5 e 15 semanas de idade.

O conteúdo de DNAmit (UA) no soro de machos SHR com 15 semanas de idade (hipertensos) foi maior que o de SHR com 5 semanas de idade (pré-hipertensos) e que os de seus controles machos Wistar com 5 e 15 semanas de idade (normotensos) (Figura 7).

Figura 7 – Expressão de NADH desidrogenase e citocromo B no soro de machos SHR e Wistar com 5 e 15 semanas de idade.



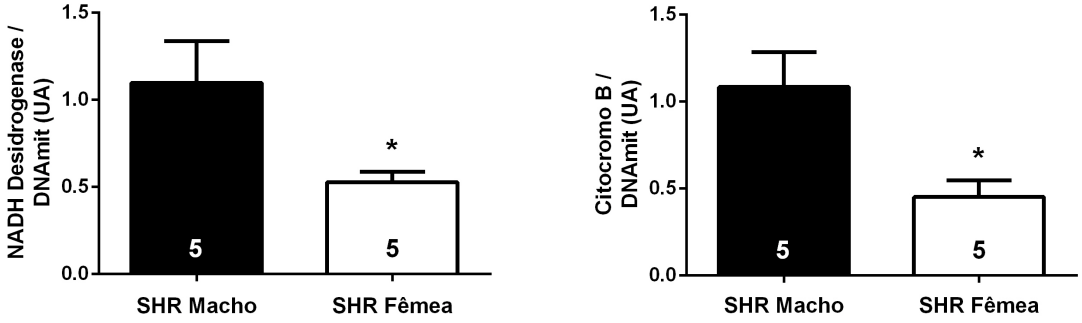
Os histogramas de barra representam a expressão em unidades arbitrárias (UA) de NADH desidrogenase e citocromo B (genes presentes apenas no DNA mitocondrial) no soro de machos SHR e Wistar com 5 e 15 semanas de idade. Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras. *p<0,05 *vs.* Wistar 5 semanas; #p<0,05 *vs.* Wistar 15 semanas; +p<0,05 *vs.* SHR 5 semanas.

4.2 Conteúdo de DNA mitocondrial no soro de machos e fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade.

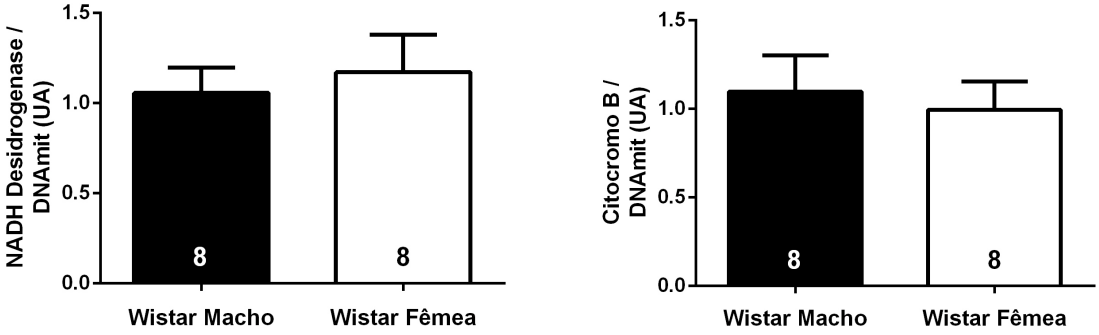
O conteúdo de DNAmit (UA) no soro de fêmeas SHR foi menor que o de machos SHR (Figura 8A). Entretanto, não houve diferença no conteúdo de DNAmit no soro de fêmeas normotensas Wistar quando comparadas com o dos machos Wistar (Figura 8B).

Figura 8 – Expressão de NADH desidrogenase e citocromo B no soro de machos e fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade.

A)



B)



Os histogramas de barra representam a expressão em unidades arbitrárias (UA) de NADH desidrogenase e citocromo B (genes presentes apenas no DNA mitocondrial) no soro de machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) com 15 semanas de idade. Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste "*t-Student*" não pareado. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras. *p<0,05 *vs.* SHR Macho.

4.3 Pressão arterial caudal de machos e fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade.

A pressão arterial caudal (mmHg) de machos e fêmeas SHR foi maior que a de machos e fêmeas Wistar. Além disso, a pressão arterial caudal de fêmeas SHR foi menor que a de machos SHR (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de pressão arterial caudal de machos e fêmeas SHR e Wistar com 15 semanas de idade.

	Pressão arterial caudal (mmHg)
Wistar Machos (12)	119,3 ± 0,86
Wistar Fêmeas (10)	119,0 ± 0,83
SHR Machos (33)	168,2 ± 1,22 *
SHR Fêmeas (38)	158,1 ± 0,91 * #

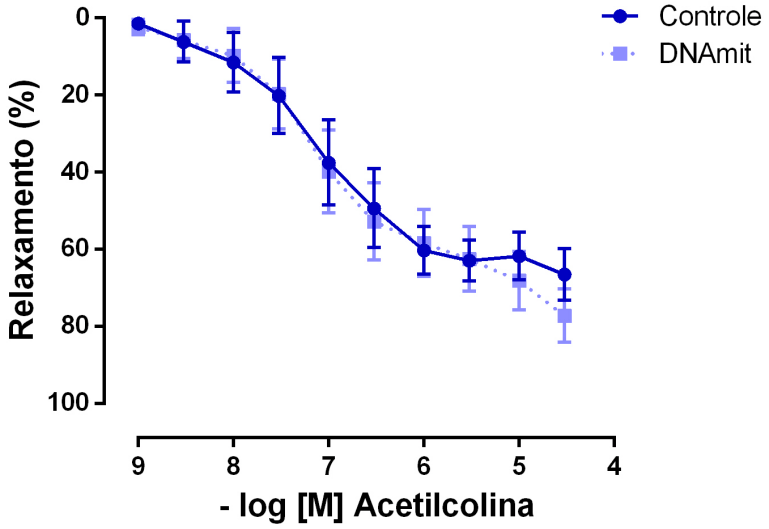
(mmHg) Milímetros de mercúrio. Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parêntesis. *p<0,05 *vs.* Wistar Machos e Fêmeas; #p<0,05 *vs.* SHR Machos.

4.4 Resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

A acetilcolina promoveu resposta vasodilatadora dependente de concentração nos anéis de aorta com endotélio isolados de todos os grupos experimentais. A pré-incubação com DNAmit não alterou a resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de aorta isolados de machos (Figura 9, Tabela 3) e fêmeas (Figura 10, Tabela 4) SHR.

Figura 9 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade.

Machos



Curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade, na presença (linha pontilhada) ou ausência (linha contínua) de DNA mitocondrial (4 µg/ml). Valores expressos como porcentagem (%) de relaxamento em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M). Cada ponto representa a média±epm.

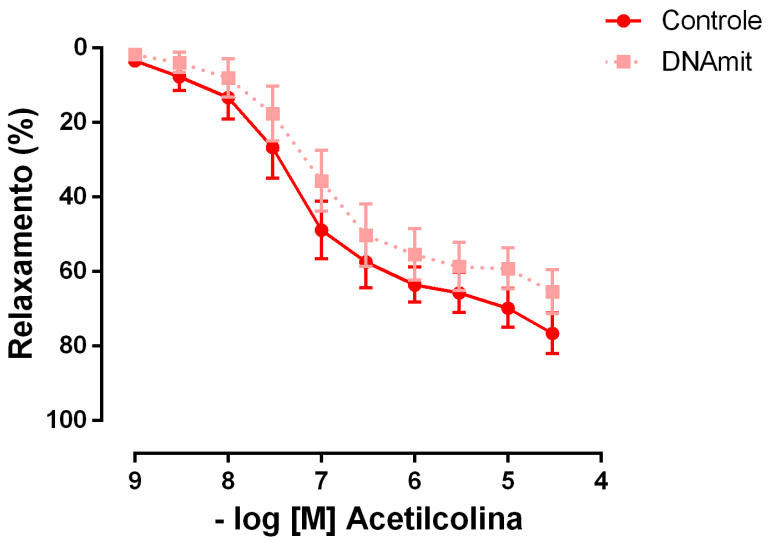
Tabela 3 – Resposta máxima e sensibilidade à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.

	Rmáx (%)	**pD2**
Controle (5)	65,33 ± 5,59	7,16 ± 0,31
DNAmit (6)	76,38 ± 6,61	6,84 ± 0,38

(Rmáx) resposta máxima, (pD2) sensibilidade ao agonista e (%) porcentagem de relaxamento obtida em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M). Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste "*t-Student*" não pareado. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parêntesis.

Figura 10 –Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

Fêmeas



Curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade, na presença (linha pontilhada) ou ausência (linha contínua) de DNA mitocondrial (4 µg/ml). Valores expressos como porcentagem (%) de relaxamento em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M). Cada ponto representa a média ± epm.

Tabela 4 – Resposta máxima e sensibilidade à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.

	Rmáx (%)	**pD2**
Controle (8)	75,55 ± 5,59	7,19 ± 0,20
DNAmit (9)	66,29 ± 4,61	7,13 ± 0,15

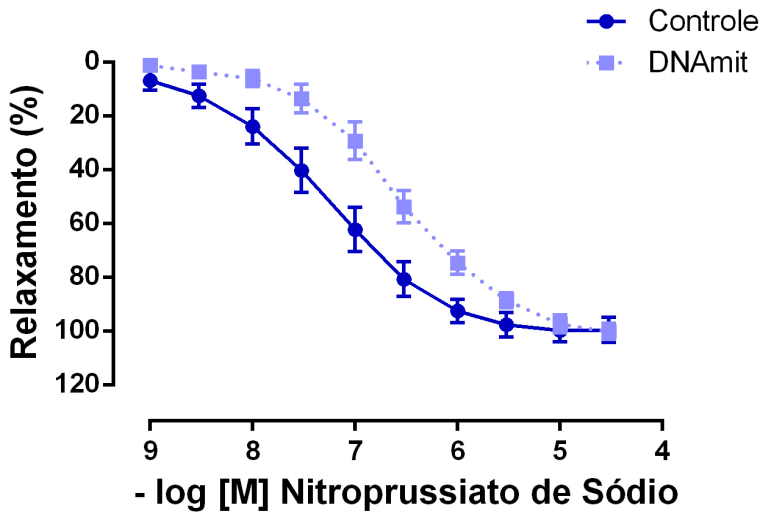
(Rmáx) resposta máxima, (pD2) sensibilidade ao agonista e (%) porcentagem de relaxamento obtida em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M). Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste "*t-Student*" não pareado. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parêntesis.

4.5 Resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

O nitroprussiato de sódio promoveu resposta vasodilatadora dependente de concentração nos anéis de aorta com endotélio isolados de todos os grupos experimentais. Nos anéis de aorta isolados de machos SHR (Figura 11, Tabela 5) a pré-incubação com DNAmit diminuiu a sensibilidade, mas não alterou a Rmáx ao nitroprussiato de sódio. Por outro lado, em anéis de aorta isolados de fêmeas SHR (Figura 12, Tabela 6) a pré-incubação com DNAmit não alterou a resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio.

Figura 11 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade.

Machos



Curvas concentração-resposta cumulativas ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade, na presença (linha pontilhada) ou ausência (linha contínua) de DNA mitocondrial (4 µg/ml). Valores expressos como porcentagem (%) de relaxamento em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M). Cada ponto representa a média ± epm.

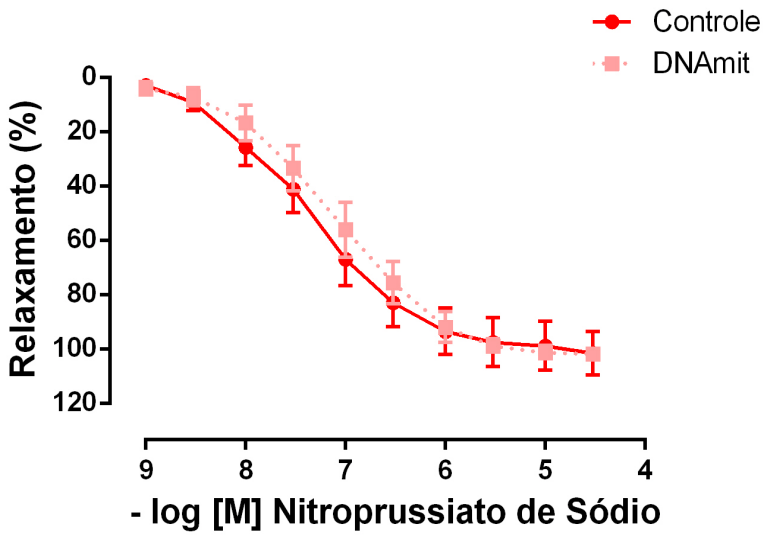
Tabela 5 – Resposta máxima e sensibilidade ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.

	Rmáx (%)	**pD2**
Controle (6)	99,66 ± 4,24	7,29 ± 0,20
DNAmit (5)	98,06 ± 3,52	6,58 ± 0,15 *

(Rmáx) resposta máxima, (pD2) sensibilidade ao agonista e (%) porcentagem de relaxamento obtida em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M). Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste "*t-Student*" não pareado. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parêntesis. *p<0,05 *vs.* Controle

Figura 12 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

Fêmeas



Curvas concentração-resposta cumulativas ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade, na presença (linha pontilhada) ou ausência (linha contínua) de DNA mitocondrial (4 µg/ml). Valores expressos como porcentagem (%) de relaxamento em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M). Cada ponto representa a média ± epm.

Tabela 6 – Resposta máxima e sensibilidade ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.

	Rmáx (%)	**pD2**
Controle (7)	99,12 ± 7,28	7,41 ± 0,18
DNAmit (6)	97,21 ± 2,54	7,11 ± 0,21

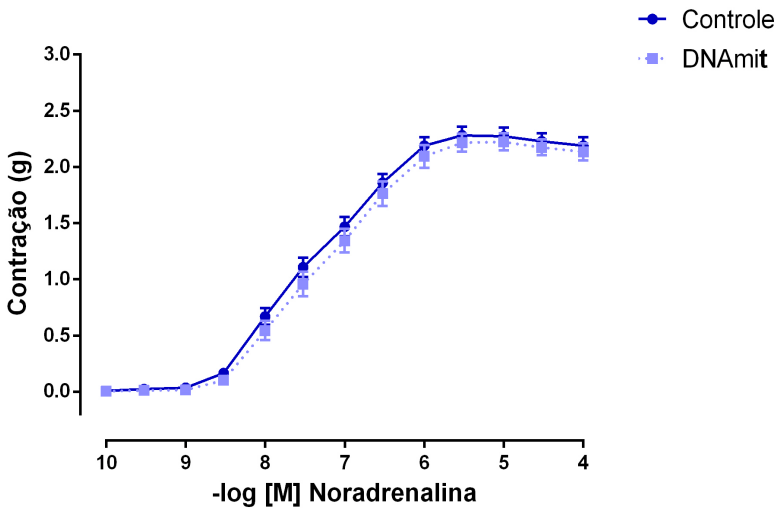
(Rmáx) resposta máxima, (pD2) sensibilidade ao agonista e (%) porcentagem de relaxamento obtida em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (10^{-6} M). Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste "*t-Student*" não pareado. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parêntesis.

4.6 Resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

A noradrenalina promoveu resposta vasoconstritora dependente de concentração nos anéis de aorta com endotélio isolados de todos os grupos experimentais. A pré-incubação com DNAmit não alterou a resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta isolados de machos (Figura 13, Tabela 7) e fêmeas (Figura 14, Tabela 8) SHR.

Figura 13 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade.

Machos



Curvas concentração-resposta cumulativas à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade, na presença (linha pontilhada) ou ausência (linha contínua) de DNA mitocondrial (4 µg/ml). Valores expressos em gramas (g) de tensão. Cada ponto representa a média ± epm.

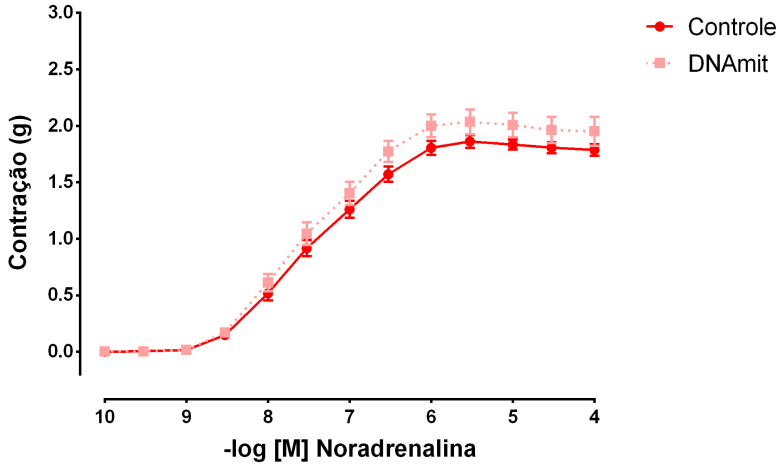
Tabela 7 – Resposta máxima e sensibilidade à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNAmit.

	Rmáx (g)	pD2
Controle (9)	2,15 ± 0,06	7,47 ± 0,08
DNAmit (9)	2,11 ± 0,06	7,34 ± 0,10

(Rmáx) resposta máxima, (pD2) sensibilidade ao agonista e (g) gramas de tensão. Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste "*t-Student*" não pareado. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parêntesis.

Figura 14 – Efeito do DNA mitocondrial sobre a resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

Fêmeas



Curvas concentração-resposta cumulativas à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade, na presença (linha pontilhada) ou ausência (linha contínua) de DNA mitocondrial (4 µg/ml). Valores expressos em gramas (g) de tensão. Cada ponto representa a média ± epm.

Tabela 8 – Resposta máxima e sensibilidade à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial.

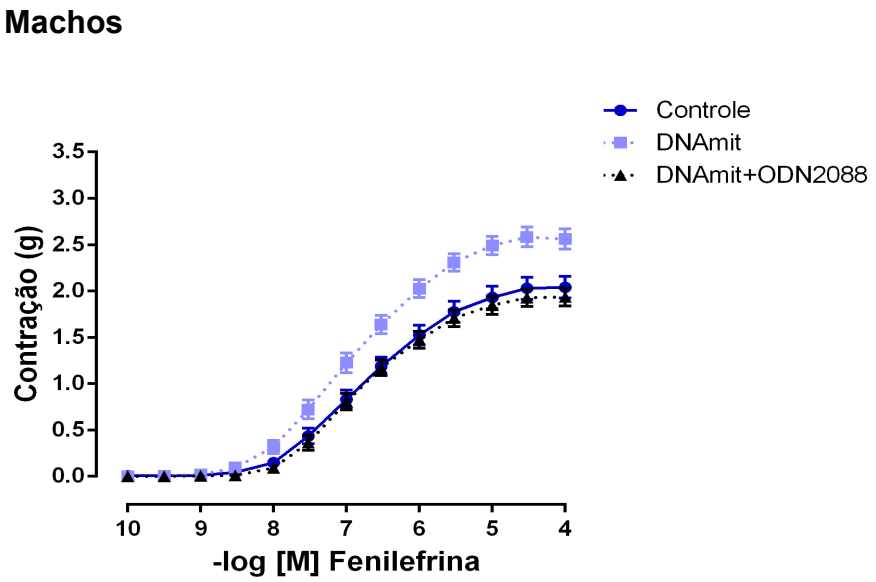
	Rmáx (g)	**pD2**
Controle (7)	1,79 ± 0,05	7,50 ± 0,07
DNAmit (8)	1,95 ± 0,10	7,55 ± 0,07

(Rmáx) resposta máxima, (pD2) sensibilidade ao agonista e (g) gramas de tensão. Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste "*t-Student*" não pareado. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parêntesis.

4.7 Resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

A fenilefrina promoveu resposta vasoconstritora dependente de concentração nos anéis de aorta com endotélio isolados de todos os grupos experimentais. Nos anéis de aorta isolados de machos SHR (Figura 15, Tabela 9) a pré-incubação com DNAmit aumentou a Rmáx à fenilefrina e esse aumento foi corrigido na presença de ODN2088 (antagonista sintético do TLR9). Por outro lado, em anéis de aorta isolados de fêmeas SHR (Figura 16, Tabela 10) a pré-incubação com DNAmit não alterou a resposta vasoconstritora à fenilefrina.

Figura 15 – Efeito do DNA mitocondrial e ODN2088 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade.



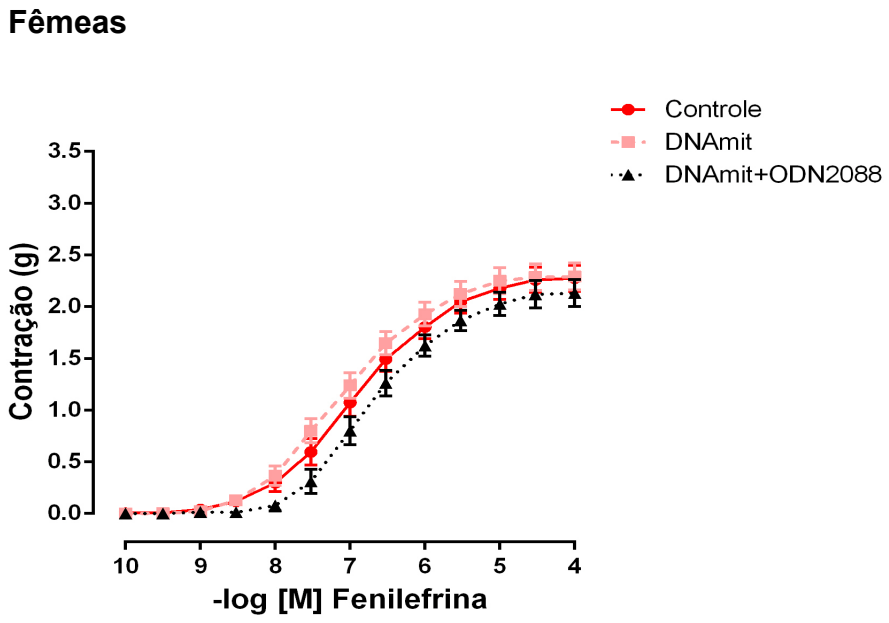
Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade, na presença (linha pontilhada) ou ausência (linha contínua) de DNA mitocondrial (4 µg/ml) e ODN2088 (antagonista do TLR9 – 1,7 µg/ml; linha pontilhada preta). Valores expressos em gramas (g) de tensão. Cada ponto representa a média ± epm.

Tabela 9 – Resposta máxima à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial e ODN2088 (antagonista do TLR9).

	Rmáx (g)
Controle (18)	2,00 ± 0,12
DNAmit (17)	2,54 ± 0,11 *
ODN2088 (4)	1,91 ± 0,11 **#**

(Rmáx) resposta máxima e (g) gramas de tensão. Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parêntesis. *p<0,05 *vs.* Controle; #p<0,05 *vs.* DNAmit.

Figura 16 – Efeito do DNA mitocondrial e ODN2088 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade.



Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade, na presença (linha pontilhada) ou ausência (linha contínua) de DNA mitocondrial (4 µg/ml) e ODN2088 (antagonista do TLR9 – 1,7 µg/ml; linha pontilhada preta). Valores expressos em gramas (g) de tensão. Cada ponto representa a média ± epm.

Tabela 10 – Resposta máxima e sensibilidade à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio isolados de fêmeas SHR com 15 semanas de idade após estímulo com DNA mitocondrial e ODN2088 (antagonista do TLR9).

	Rmáx (g)	**pD2**
Controle (15)	2,21 ± 0,11	6,98 ± 0,14
DNAmit (16)	2,24 ± 0,12	7,14 ± 0,10
ODN2088 (4)	2,09 ± 0,15	6,71 ± 0,07

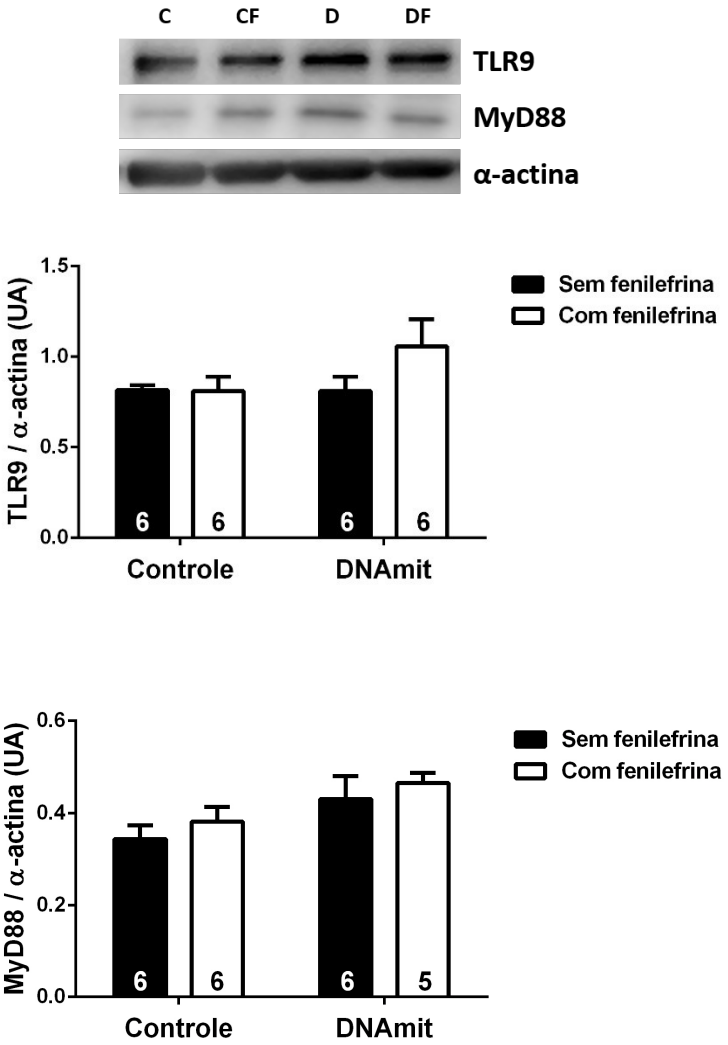
(Rmáx) resposta máxima, (pD2) sensibilidade ao agonista e (g) gramas de tensão. Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se entre parêntesis.

4.8 Expressão proteica do TLR9 e da molécula adaptadora MyD88 em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

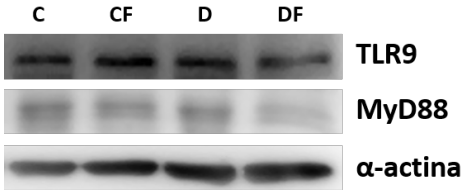
O estímulo com DNAmit na presença ou ausência de fenilefrina não alterou a expressão proteica (UA) do TLR9 e da molécula adaptadora MyD88 em aortas isoladas de machos (Figura 17A) e de fêmeas SHR (Figura 17B).

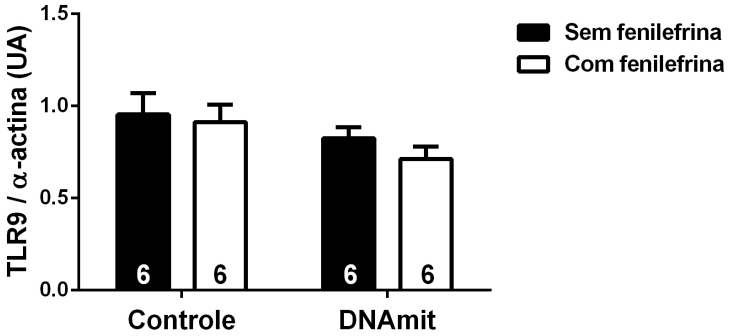
Figura 17 – Expressão proteica do TLR9 e da molécula adaptadora MyD88 em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

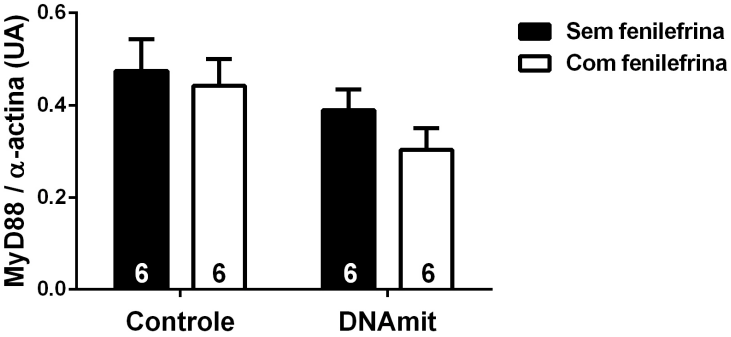
A) Machos



B) Fêmeas







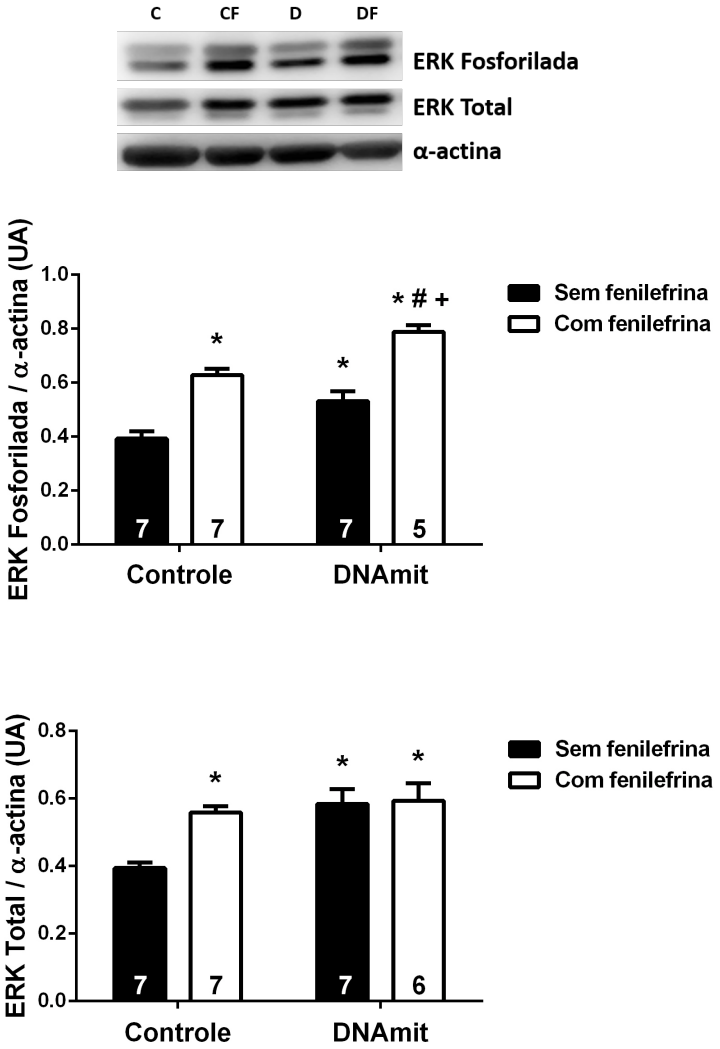
Os histogramas de barras representam a expressão proteica em unidades arbitrárias (UA) do TLR9 e da molécula adaptadora MyD88 em aortas isoladas de machos (A) e fêmeas (B) SHR com 15 semanas de idade incubadas com DNA mitocondrial (4 µg/ml) e/ou fenilefrina (10^{-5} M). As figuras representativas do Western Blotting encontram-se acima dos histogramas de barras (C: Controle sem fenilefrina; CF: Controle com fenilefrina; D: DNAmit sem fenilefrina; DF: DNAmit com fenilefrina). Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras.

4.9 Expressão proteica da ERK1/2 fosforilada e total em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

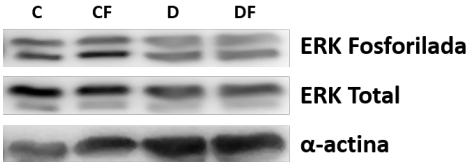
Em aortas isoladas de machos SHR (Figura 18A), tanto o estímulo com fenilefrina quanto o estímulo com DNAmit aumentaram a expressão proteica (UA) da ERK1/2 fosforilada e total, sendo que o aumento da fosforilação da ERK1/2 foi potencializado na presença do DNAmit juntamente com a fenilefrina. Já em aortas isoladas de fêmeas SHR (Figura 18B) o estímulo com DNAmit reduziu a expressão proteica da ERK1/2 fosforilada e o estímulo com DNAmit juntamente com a fenilefrina reduziu a expressão proteica da ERK1/2 fosforilada e total.

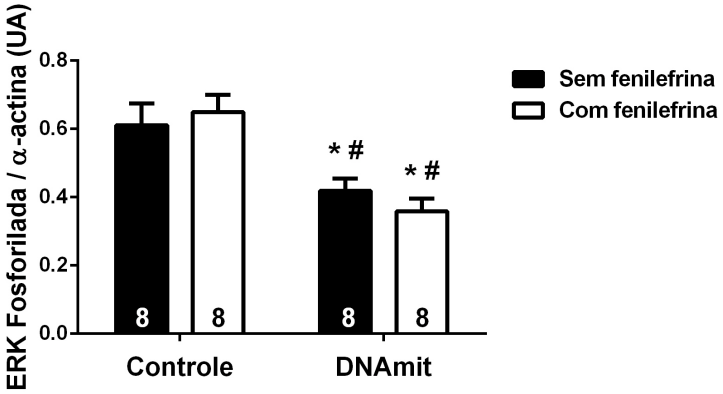
Figura 18 – Expressão proteica da ERK1/2 fosforilada e total em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

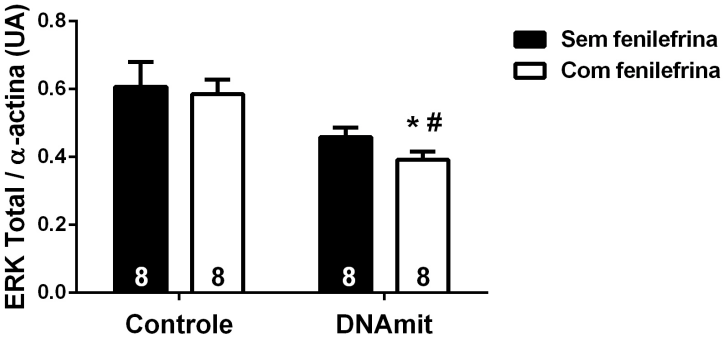
A) Machos



B) Fêmeas







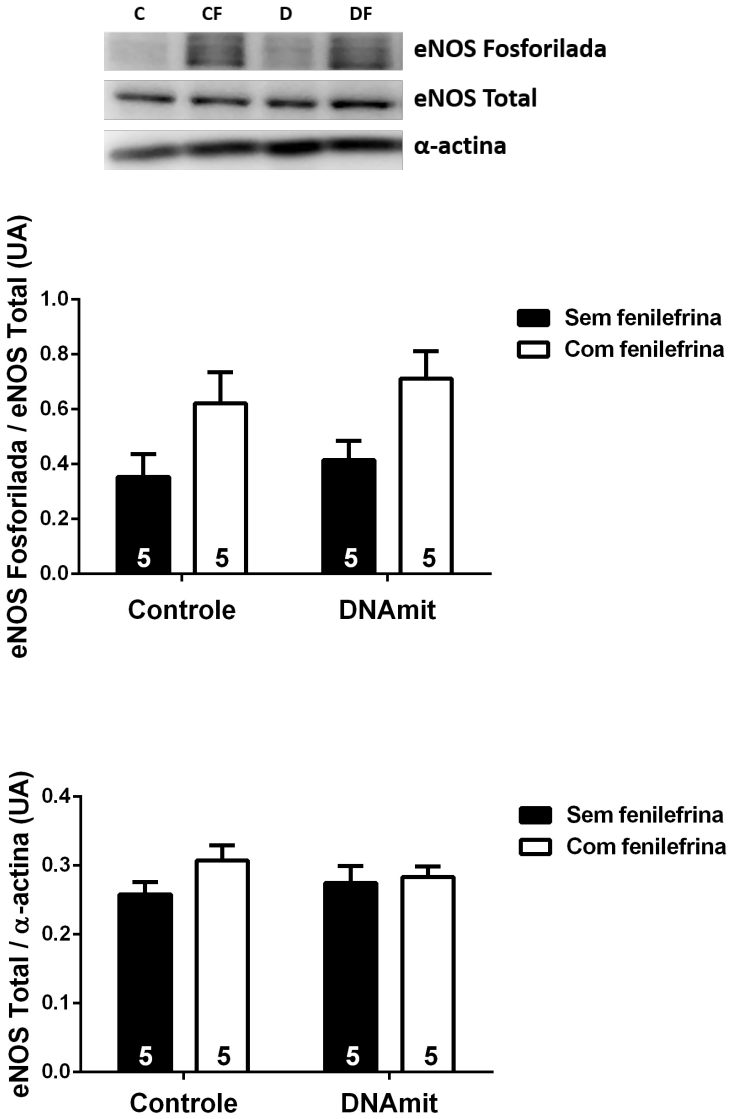
Os histogramas de barras representam a expressão proteica em unidades arbitrárias (UA) da ERK1/2 fosforilada e total em aortas isoladas de machos (A) e fêmeas (B) SHR com 15 semanas de idade incubadas com DNA mitocondrial (4 µg/ml) e/ou fenilefrina (10^{-5} M). As figuras representativas do Western Blotting encontram-se acima dos histogramas de barras (C: Controle sem fenilefrina; CF: Controle com fenilefrina; D: DNAmit sem fenilefrina; DF: DNAmit com fenilefrina). Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras. *p<0,05 *vs.* Controle sem fenilefrina; #p<0,05 *vs.* Controle com fenilefrina; +p<0,05 *vs.* DNAmit sem fenilefrina.

4.10 Expressão proteica da eNOS fosforilada e total em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

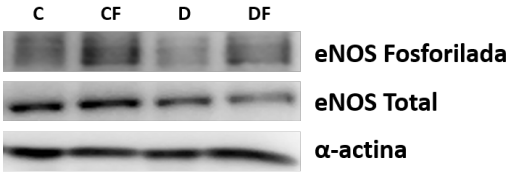
O estímulo com DNAmit na presença ou ausência de fenilefrina não alterou a expressão proteica (UA) da eNOS fosforilada e total em aortas isoladas de machos (Figura 19A) e de fêmeas SHR (Figura 19B).

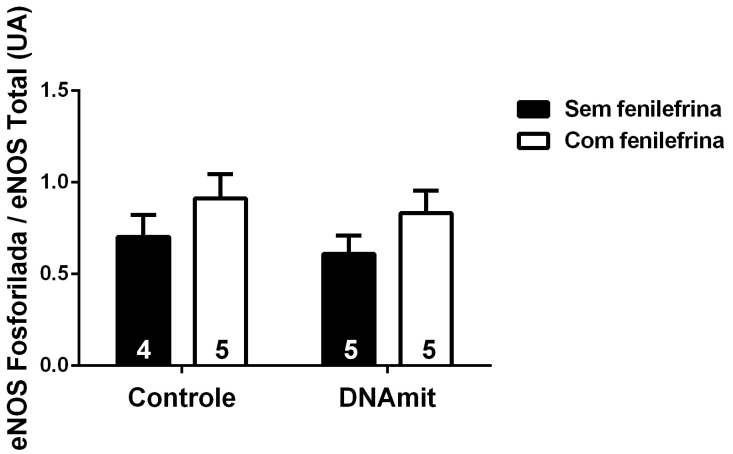
Figura 19 – Expressão proteica da eNOS fosforilada e total em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

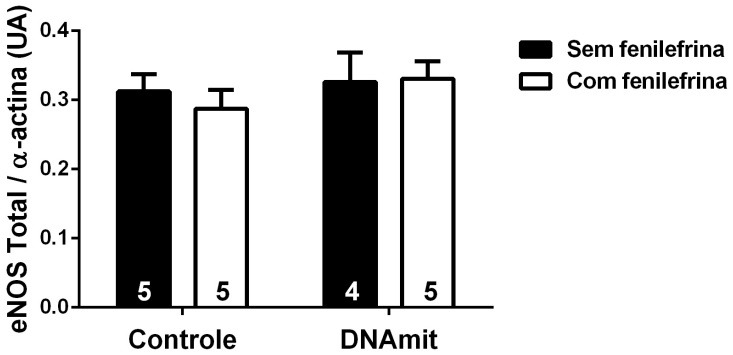
A) Machos



B) Fêmeas







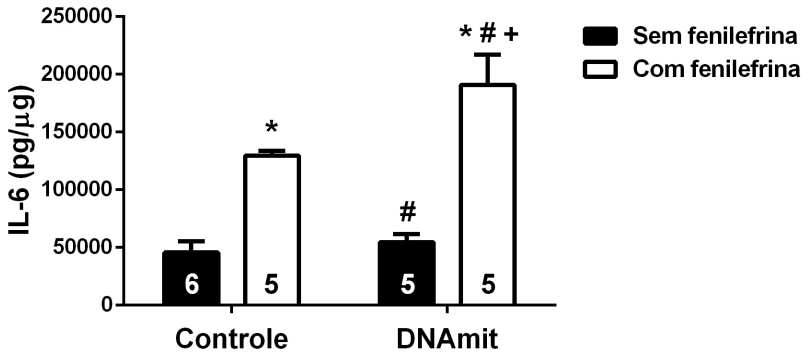
Os histogramas de barras representam a expressão proteica em unidades arbitrárias (UA) da eNOS fosforilada e total em aortas isoladas de machos (A) e fêmeas (B) SHR com 15 semanas de idade incubadas com DNA mitocondrial (4 µg/ml) e/ou fenilefrina (10^{-5} M). As figuras representativas do Western Blotting encontram-se acima dos histogramas de barras (C: Controle sem fenilefrina; CF: Controle com fenilefrina; D: DNAmit sem fenilefrina; DF: DNAmit com fenilefrina). Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras.

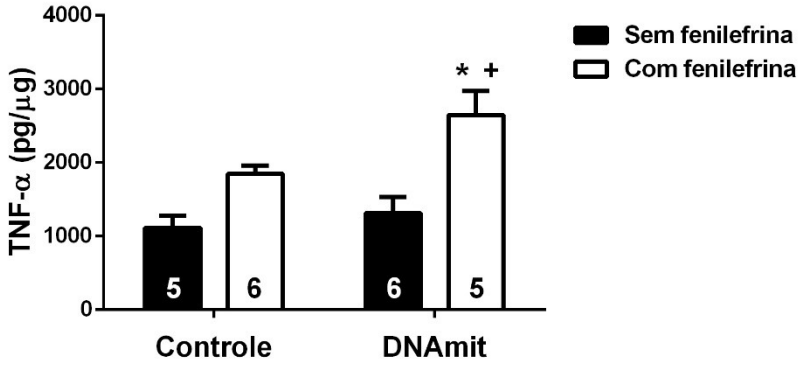
4.11 Concentração de IL-6, TNF-α e IL-10 em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

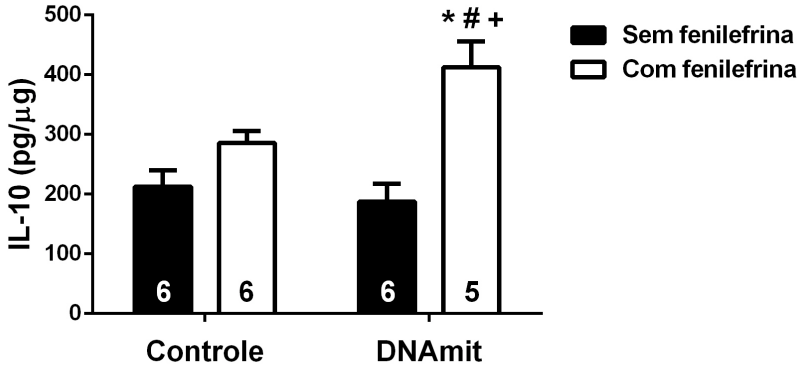
Em aortas isoladas de machos SHR (Figura 20A) o estímulo com fenilefrina aumentou a concentração (pg/µg) de IL-6, sendo que esse aumento foi potencializado na presença de DNAmit. Além disso, o estímulo com DNAmit juntamente com a fenilefrina também aumentou a concentração de TNF-α e IL-10. Em aortas isoladas de fêmeas SHR (Figura 20B) o estímulo com fenilefrina também aumentou a concentração (pg/µg) de IL-6, porém esse aumento não foi potencializado na presença de DNAmit. Além disso, nessas aortas isoladas de fêmeas SHR o estímulo com DNAmit reduziu a concentração de TNF-α e não alterou a concentração de IL-10.

Figura 20 – Concentração de IL-6, TNF-α e IL-10 em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

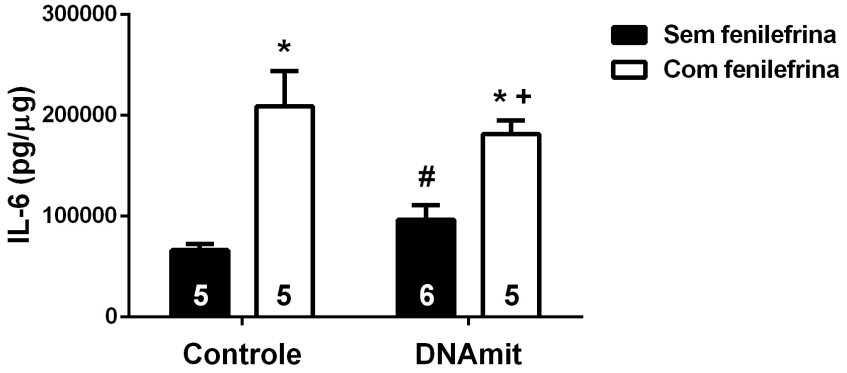
A) Machos

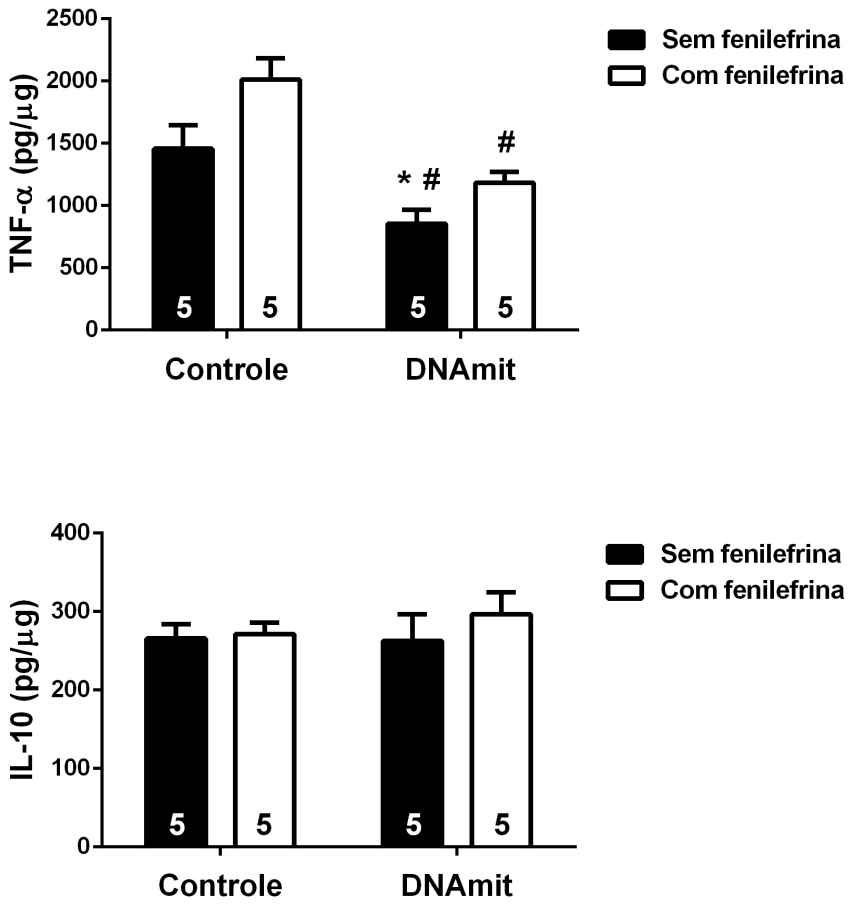



4000
3000
2000
1000
0
TNF-α (pg/μg)
* +
5
6
6
5
Controle
DNAmit
Sem fenilefrina
Com fenilefrina


500
400
300
200
100
0
IL-10 (pg/μg)
* # +
6
6
6
5
Controle
DNAmit
Sem fenilefrina
Com fenilefrina

B) Fêmeas


300000
200000
100000
0
IL-6 (pg/μg)
*
#
* +
5
5
6
5
Controle
DNAmit
Sem fenilefrina
Com fenilefrina



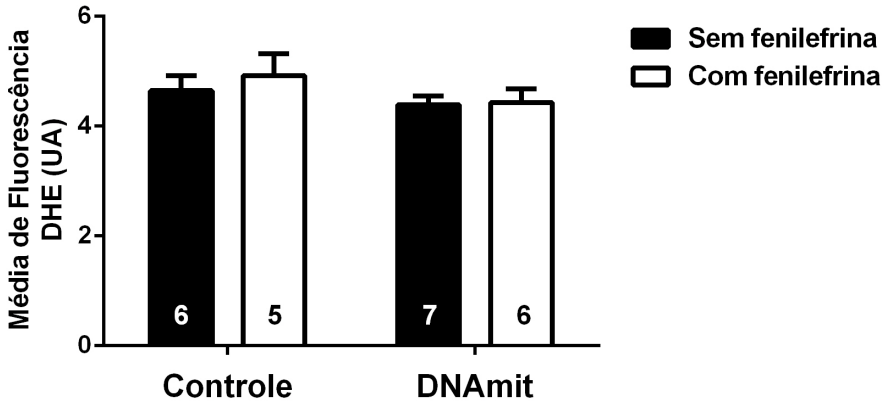
Os histogramas de barras representam a concentração em pg/µg de IL-6, TNF-α e IL-10 em aortas isoladas de machos (A) e fêmeas (B) SHR com 15 semanas de idade incubadas com DNA mitocondrial (4 µg/ml) e/ou fenilefrina (10^{-5} M). Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras. *p<0,05 *vs.* Controle sem fenilefrina; #p<0,05 *vs.* Controle com fenilefrina; +p<0,05 *vs.* DNAmit sem fenilefrina.

4.12 Detecção de EROs em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

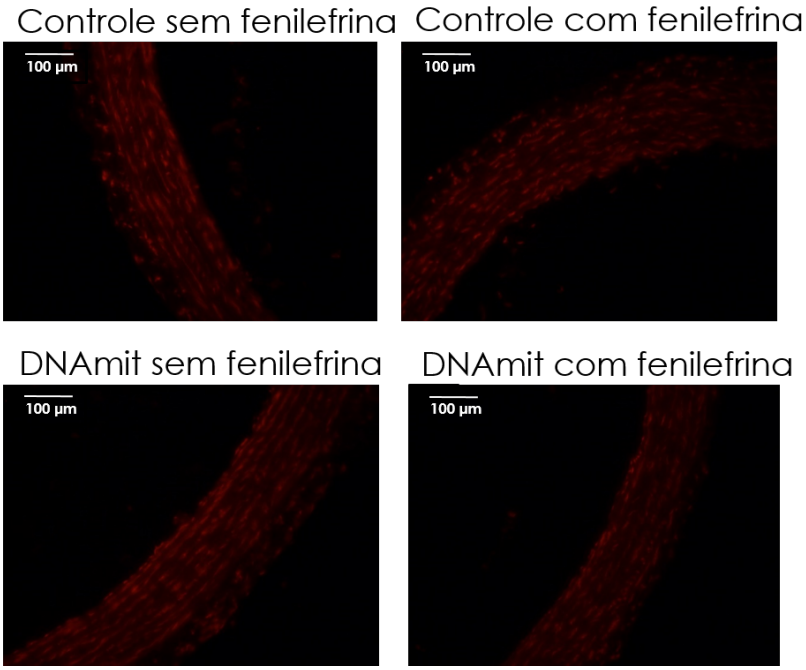
Em aortas isoladas de machos SHR (Figura 21A) o estímulo com DNAmit na presença ou ausência de fenilefrina não alterou o conteúdo de EROs (UA). Por outro lado, em aortas isoladas de fêmeas SHR (Figura 21B) o estímulo com fenilefrina aumentou o conteúdo de EROs e a pré-incubação com DNAmit impediu esse aumento causado pela fenilefrina.

Figura 21 – Detecção de EROs em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR com 15 semanas de idade.

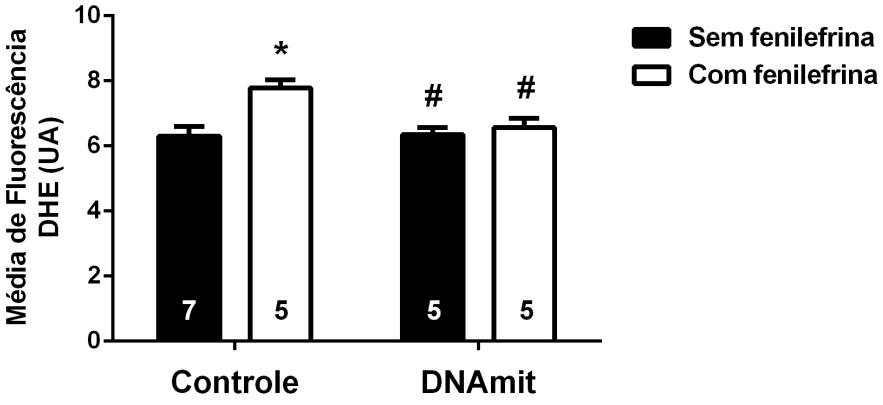
A) Machos



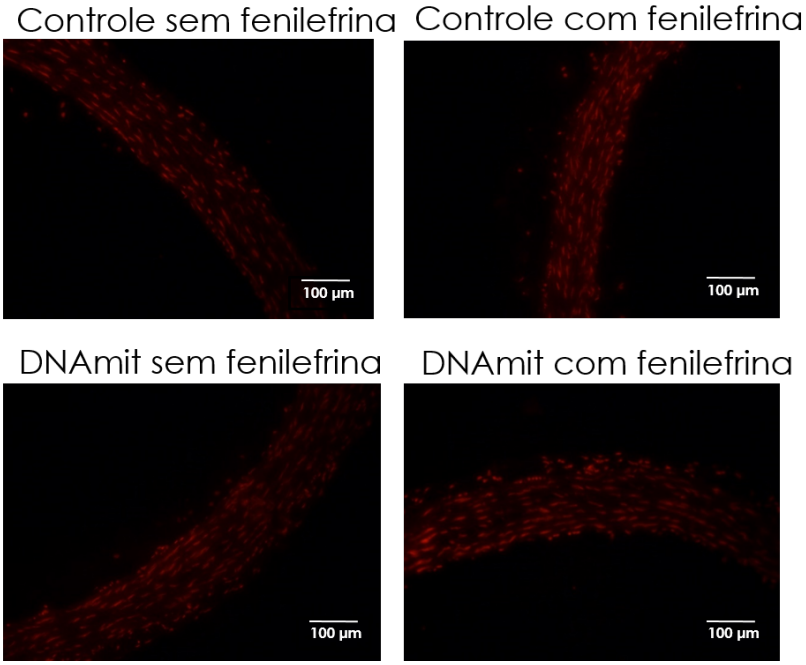
Machos



B) Fêmeas



Fêmeas



Os histogramas de barras representam o conteúdo de EROs em unidades arbitrárias (UA) em aortas isoladas de machos (A) e fêmeas (B) SHR com 15 semanas de idade incubadas com DNA mitocondrial (4 µg/ml) e/ou fenilefrina (10^{-5} M). As figuras representativas do ensaio de Dihidroetidina (DHE) encontram-se abaixo dos histogramas de barras. Valores expressos como média ± epm. Foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras. *p<0,05 *vs.* Controle sem fenilefrina; #p<0,05 *vs.* Controle com fenilefrina.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi o primeiro a demonstrar que há diferença sexual associada à liberação do DNAmit na hipertensão arterial, uma vez que fêmeas SHR apresentaram menor conteúdo de DNAmit circulante em comparação ao dos machos SHR. Além disso, demonstramos também que em anéis de aorta isolados de SHR adultos a incubação com DNAmit, agonista endógeno do TLR9, induziu respostas vasculares e moleculares diferentes em machos e fêmeas, sugerindo uma possível diferença sexual na ação do DNAmit ou na ativação do TLR9.

Na década de 1990, Polly Matzinger (51) introduziu uma nova teoria na área da imunologia, denominada de “Danger Model”. Esta teoria afirma que as células do sistema imunológico são ativadas não apenas por PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos), mas também por substâncias provenientes de células lesadas e/ou por estresse metabólico do próprio hospedeiro, os DAMPs (padrões moleculares associados à danos), os quais são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões como os TLRs, ativando a resposta imunológica mesmo na ausência de patógenos.

Neste contexto, diversos trabalhos já demonstraram que na hipertensão arterial há aumento de algumas moléculas endógenas como PCR, angiotensina II, HSP60, HSP70, IL-1α, proteína amiloide A, fibrinogênio, LDL oxidada, ácido hialurônico e ácido úrico, que podem agir como DAMPs e ativar os TLRs, contribuindo para o processo inflamatório presente na hipertensão arterial e sendo um dos possíveis elos entre hipertensão arterial, inflamação e ativação do sistema imunológico (52-61).

De fato, nesse trabalho demonstramos que o conteúdo de DNAmit, um DAMP agonista do TLR9, aumenta com o desenvolvimento da hipertensão arterial, uma vez que SHR adultos (hipertensos) apresentaram maior conteúdo de DNAmit no soro em comparação ao dos SHR jovens (pré-hipertensos) e ao dos ratos Wistar adultos e jovens (normotensos). Semelhante aos nossos achados, autores observaram também que há aumento no conteúdo de DNAmit no plasma de machos SHR adultos em comparação ao dos ratos Wistar Kyoto (95).

A principal fonte de liberação de DNAmit é a necrose celular, situação que está presente em diversas doenças e alterações cardiovasculares associadas à hipertensão arterial (75-82). Demonstramos em nosso trabalho que machos SHR além

de apresentarem maiores valores pressóricos em comparação aos das fêmeas SHR, apresentaram também maior conteúdo de DNAmit circulante, diferenças essas que não foram observadas entre os animais normotensos Wistar machos e fêmeas. Portanto, é possível supor que a sobrecarga pressórica induza maior dano celular e consequentemente maior liberação de DNAmit.

De fato, já foi demonstrado que machos SHR adultos tratados com hidroclorotiazida e reserpina, apresentaram redução do conteúdo plasmático de DNAmit à valores semelhantes aos observados em ratos Wistar Kyoto (95), dados esses que corroboram com a nossa hipótese de possível associação entre valores pressóricos e liberação diferencial de DNAmit circulante.

É importante destacar que, em virtude de não termos encontrado diferenças nos valores pressóricos e conteúdo de DNAmit circulante entre os ratos normotensos Wistar machos e fêmeas, os demais experimentos foram realizados apenas em animais hipertensos SHR machos e fêmeas.

Após ativado, o TLR9 pode ativar duas vias de sinalização diferentes, uma dependente e uma independente da molécula adaptadora MyD88. A ativação da via dependente de MyD88 está associada à ativação de MAPKs e NF-κB, induzindo a produção de diversas moléculas pró-inflamatórias (46, 50, 68-70). Dessa forma, uma maior ativação do TLR9 devido ao aumento no conteúdo de DNAmit poderia contribuir para o processo inflamatório crônico de baixa intensidade presente na hipertensão arterial e assim exacerbar a disfunção vascular presente nesta condição, uma vez que as citocinas podem influenciar a resposta vascular por induzirem a síntese de diversas substâncias vasoativas (35).

Em virtude disso, no presente trabalho avaliamos em anéis de aortas com endotélio isolados de animais SHR adultos se a pré-incubação com DNAmit extraído do fígado dos machos e fêmeas SHR, poderia alterar a resposta vascular à substâncias vasodilatadoras (acetilcolina ou nitroprussiato de sódio) e vasoconstritoras (noradrenalina ou fenilefrina) e se essa resposta vascular poderia ser diferente entre machos e fêmeas.

É importante destacar que a pureza do DNAmit extraído do fígado desses animais foi confirmada pela técnica de RT-PCR, apresentando altas concentrações de NADH desidrogenase e citocromo B e baixas concentrações de GAPDH e 16S ribossomal bacteriano, confirmando que esse DNA obtido era predominantemente

mitocondrial e excluindo possível contaminação com DNA genômico ou DNA bacteriano (dados não apresentados).

Para avaliar se o DNAmit poderia exacerbar a disfunção endotelial presente nesses animais SHR, realizamos curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina, um vasodilatador dependente do endotélio. A acetilcolina ao agir em receptores muscarínicos acoplados a proteína Gq presentes na célula endotelial induz a ativação da fosfolipase C (PLC) o que leva à formação dos segundos mensageiros trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Esses segundos mensageiros estimulam a abertura de canais de Ca^{2+} presentes no retículo sarcoplasmático e de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem, aumentando assim, a concentração intracelular de Ca^{2+} (10, 96, 97).

O Ca^{2+} se liga então a proteína citoplasmática calmodulina, formando o complexo Ca^{2+}-calmodulina, que na célula endotelial é capaz de ativar a eNOS e levar a produção de óxido nítrico. O óxido nítrico por sua vez, difunde-se para as células do músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel, o que produz GMPc (monofosfato cíclico de guanosina). Como consequência, ocorre redução da concentração citoplasmática de Ca^{2+} e redução da afinidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+}, resultando em relaxamento do músculo liso vascular (10, 96, 97).

Em nosso trabalho, observamos que a pré-incubação com DNAmit em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR não alterou a resposta vasodilatadora à acetilcolina, indicando que provavelmente o estímulo vascular com esse DAMP não afeta a produção de óxido nítrico endotelial. Esse resultado é reforçado pelo fato de que a pré-incubação com DNAmit também não alterou a expressão proteica da eNOS na aorta desses animais, a principal enzima responsável pela produção de óxido nítrico no endotélio vascular.

Apesar disso, em machos Sprague-Dawley tratados por três dias com ODN2395, agonista sintético do TLR9, os autores observaram que há redução na vasodilatação à acetilcolina em anéis de aorta (95). Entretanto, é importante destacar que após o tratamento com ODN2395 esses animais apresentaram aumento da pressão arterial sistólica, portanto, é possível que as alterações observadas pelos autores na reatividade vascular sejam decorrentes dos maiores valores pressóricos desses animais e não necessariamente da ação direta desse agonista do TLR9 no endotélio vascular.

Em outro grupo experimental, realizamos a reatividade de anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR ao nitroprussiato de sódio, um nitrato inorgânico doador de óxido nítrico cuja ação vasodilatadora ocorre principalmente via ação direta em células do músculo liso vascular, apesar do endotélio vascular potencializar o seu efeito vasodilatador (98).

O nitroprussiato de sódio é composto por um íon de ferro complexado a cinco íons de cianeto e uma molécula de óxido nítrico. O mecanismo pelo qual o nitroprussiato de sódio libera o óxido nítrico pode ocorrer por duas formas distintas, uma enzimática via ação de enzimas como NADPH oxidade (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase) e citocromo P450 que catalisam a reação de liberação do óxido nítrico ou de forma não enzimática via ação de ânions tiolatos que decompõem o complexo e assim liberam o óxido nítrico (99). Além disso, sabe-se também que o nitroprussiato de sódio pode aumentar a concentração de Ca^{2+} no endotélio vascular e reduzir a concentração de Ca^{2+} no músculo liso vascular, fatos que também auxiliam no efeito vasodilatador induzido por esse agonista (98).

Após a pré-incubação com DNAmit, pudemos observar que há diferença entre machos e fêmeas na vasodilatação induzida por esse doador de óxido nítrico, uma vez que houve redução na sensibilidade ao nitroprussiato de sódio apenas em anéis de aorta isolados de machos SHR e não em aortas isoladas de fêmeas. É importante destacar que já foi descrito que em aortas de camundongos machos Balb/c a presença de estresse oxidativo com aumento de EROs e a presença de processo inflamatório com aumento de NF-κB, COX, TNF-α e IL-6 estão associados ao desenvolvimento de tolerância ao nitroprussiato de sódio e consequente redução na potência de relaxamento a esse vasodilatador (100).

Embora em nosso trabalho não tenhamos observado aumento na concentração de EROs ou de TNF-α e IL-6 em aortas isoladas de machos SHR após incubação com DNAmit, observamos que houve aumento da fosforilação da ERK1/2 e da expressão proteica da COX-1 (dados não mostrados). Portanto, sabendo que a cascata de sinalização clássica do TLR9 está associada com ativação de MAPKs e NF-κB e consequente desenvolvimento de processo inflamatório, é possível sugerir que em nosso trabalho o estímulo com DNAmit aumentou o estado inflamatório local, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de tolerância ao nitroprussiato de sódio e redução na sensibilidade a esse vasodilatador em aortas isoladas de machos SHR.

Sabe-se que o processo inflamatório pode também alterar a resposta vascular à agentes vasoconstritores. De fato, autores demonstraram que a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina foi potencializada após a incubação com as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF-α em anéis de aorta isolados de fêmeas Sprague-Dawley (101, 102). Sendo assim, avaliamos em nosso estudo se a pré-incubação com DNAmit além de reduzir a sensibilidade vascular ao agente vasodilatador nitroprussiato de sódio, poderia também alterar a resposta vascular aos agentes vasoconstritores noradrenalina e fenilefrina.

A noradrenalina é um agonista não seletivo de receptores α e β-adrenérgicos cujo efeito vasoconstritor ocorre principalmente via ativação de receptores α1-adrenérgicos presentes em células do músculo liso vascular. A ativação desses receptores leva a ativação da PLC e formação de IP_3 e DAG, induzindo aumento na concentração intracelular de Ca^{2+}. No músculo liso vascular, a formação do complexo Ca^{2+}-calmodulina é capaz de ativar a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e induzir assim, a contração da célula muscular lisa (10, 96).

No nosso trabalho, observamos que a pré-incubação com DNAmit não alterou a resposta vasoconstritora à noradrenalina em anéis de aorta com endotélio isolados de machos e fêmeas SHR. Apesar disso, é importante salientar que a noradrenalina é um agonista não seletivo de receptores α e β-adrenégicos e que a ativação de receptores α2 na célula endotelial induz a produção de óxido nítrico devido ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+}. Já a ativação de receptores β leva a ativação da proteína quinase A (PKA) que na célula endotelial também induz a produção de óxido nítrico e na célula muscular lisa diminui a concentração intracelular de Ca^{2+}, fatores esses que poderiam reduzir a resposta contrátil da noradrenalina em receptores α1 presentes no músculo liso vascular (10).

De fato, autores demonstraram que a remoção mecânica do endotélio vascular aumentou a resposta máxima induzida pela noradrenalina em aortas de machos Wistar (103), mostrando que a presença do endotélio vascular atenua a resposta vasoconstritora induzida por esse agonista, o que poderia justificar em parte a ausência de efeito do DNAmit sobre a resposta à noradrenalina observada em nosso trabalho.

Em vista do descrito acima, avaliamos também o efeito da pré-incubação com DNAmit sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, um agonista seletivo α1-

adrenérgico cujo mecanismo de indução de contração vascular é semelhante ao da noradrenalina (10). Em nosso trabalho, demonstramos que a pré-incubação com DNAmit aumentou a resposta máxima à fenilefrina apenas em anéis de aorta isolados de machos SHR, sendo que essa hiperresponsividade foi corrigida pelo ODN2088, antagonista do TLR9, confirmando que essa hiperresponsividade à fenilefrina após incubação com DNAmit ocorre via ativação desse receptor.

Além disso, é importante destacar que os dados obtidos com a reatividade vascular ao nitroprussiato de sódio e à fenilefrina, em conjunto com os resultados da acetilcolina e noradrenalina, nos sugerem que o estímulo com DNAmit provavelmente induz alterações no músculo liso vascular com pouca ou nenhuma ação sobre as células endoteliais em aortas isoladas de machos SHR.

Além disso, podemos sugerir também que o DNAmit via ativação do TLR9 induz respostas vasculares distintas em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR, podendo esse ser um dos fatores responsáveis pela diferença sexual presente na hipertensão arterial, uma vez que machos SHR apresentaram maior conteúdo de DNAmit circulante disponível para ativar o TLR9 em comparação as fêmeas SHR.

Após a constatação que o estímulo do TLR9 via incubação com DNAmit induziu respostas vasculares distintas em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR, nossa próxima etapa foi investigar as possíveis vias de sinalização responsáveis por esse efeito. Em trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa, demonstramos que o bloqueio do TLR4 via administração intraperitoneal de anticorpo anti-TLR4 em machos SHR, reduziu a expressão proteica do TLR4 em arteríolas mesentéricas de resistência e no ventrículo esquerdo desses animais (31, 63, 64).

Além disso, outros autores demonstraram também que o estímulo do TLR4 com lipopolissacarídeo (LPS) está associado ao aumento de sua própria expressão em cardiomiócitos e células endoteliais coronarianas de machos Sprague-Dawley (104), portanto, é possível sugerir que a expressão dos TLRs seja autorregulável.

Neste contexto, investigamos em nosso trabalho se a pré-incubação com DNAmit poderia aumentar a expressão proteica do TLR9, indicando uma maior ativação desse receptor, o que poderia justificar os achados obtidos nos ensaios de reatividade vascular. Entretanto, nenhuma diferença foi observada no conteúdo proteico do TLR9 e da molécula adaptadora MyD88 em aorta de machos e fêmeas SHR após o estímulo com DNAmit.

Os TLR9 ficam principalmente localizados na membrana do retículo endoplasmático e na presença do DNAmit podem migrar para vesículas endossomais (68). É importante destacar que já foi descrito que a migração do TLR9 para endossomos e sua posterior clivagem proteolítica são pré-requisitos para a ativação da via clássica (inflamatória) desses receptores. Embora a isoforma completa (150kDa) e a isoforma clivada (80kDa) do TLR9 sejam capazes de ligarem-se ao DNAmit, somente a isoforma clivada recruta a molécula adaptadora MyD88 e induz a ativação de moléculas pró-infamatórias (69, 105, 106).

Neste sentido, é importante destacar que em nosso trabalho avaliamos a isoforma completa do TLR9 (150kDa), o que não necessariamente indicaria ativação da via inflamatória desse receptor, fato que poderia justificar não termos encontrado aumento no conteúdo proteico do TLR9 em aortas de machos e fêmeas SHR após estímulo com DNAmit. Além disso, com exceção do TLR3, todos os outros subtipos dos TLRs também podem ativar MyD88 (50), mostrando que esta molécula adaptadora não é exclusiva da sinalização do TLR9 e fazendo-se necessário portanto, a aplicação de técnicas mais específicas, como quantificação proteica após ensaio de imunoprecipitação, para assim obtermos a real fração do TLR9 ativa e ligada a MyD88 após o estímulo com DNAmit.

A ativação da sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88 envolve a ativação de MAPKs e NF-κB, induzindo assim, a síntese de diversas moléculas pró-inflamatórias (46, 50). Outro aspecto relevante, é que já foi demonstrado que a ativação de receptores α2-adrenérgicos pode levar a maior atividade da ERK1/2 (107).

De fato, em nosso trabalho observamos que apenas em aortas isoladas de machos SHR a incubação com fenilefrina aumentou a expressão proteica da ERK1/2, o que também foi observado após incubação com DNAmit. É importante ressaltar que esse aumento na fosforilação da ERK1/2 foi potencializado quando essas aortas provenientes de machos SHR foram pré-incubadas com DNAmit juntamente com a fenilefrina. Além disso, diferente do ocorrido em aortas de machos, a pré-incubação com DNAmit em aortas isoladas de fêmeas reduziu a fosforilação da ERK1/2, o que corrobora com a nossa hipótese de ação diferencial do DNAmit em aortas de machos e fêmeas SHR.

Dentre as MAPKs, a ERK1/2 é a mais estudada na hipertensão arterial uma vez que trabalhos já demonstraram que a sua ativação pode modificar a contração do

músculo liso vascular (108). Os mecanismos pelos quais a ERK1/2 favorece a contração vascular não são completamente compreendidos, entretanto até o momento há duas possíveis hipóteses. Uma delas é que a ativação da ERK1/2 leva a fosforilação e inativação da caldesmona, uma proteína que quando ativada bloqueia o sítio de ligação da actina com a miosina, portanto a fosforilação e inativação da caldesmona pela ERK1/2 acarreta em maior ligação entre os filamentos de actina e miosina e facilita o processo de contração das células musculares lisas (109). Outra hipótese é que a ERK1/2 ativa a MLCK, o que consequentemente aumenta a fosforilação das cadeias leves de miosina e a sua interação com os filamentos de actina, favorecendo o processo de contração vascular (110).

Portanto, tendo em vista a influência da ERK1/2 no processo de contração vascular, é possível sugerir que em nosso trabalho uma maior ativação da ERK1/2 após estímulo com DNAmit induza maior fosforilação da caldesmona e da MLCK, facilitando o processo de contração das células musculares lisas, o que poderia justificar em parte os nossos resultados de reatividade vascular em anéis de aorta isolados de machos SHR.

A ativação da ERK1/2 também é capaz de regular a síntese de diversas moléculas pró-inflamatórias como interleucinas, TNF-α, COX2 e a ativação de NF-κB, contribuindo para o desenvolvimento de processo inflamatório (111). Já é bem estabelecido que as citocinas podem afetar a resposta vascular, uma vez que podem induzir genes que sintetizam diversos mediadores como prostanóides, leucotrienos, bradicinina, óxido nítrico, EROs e enzimas como COX2 e iNOS, sendo que todos esses mediadores podem alterar a resposta vascular (35).

Sabe-se que a IL-6 é uma importante citocina pró-inflamatória que induz efeitos locais e sistêmicos, incluindo a indução de diversos outros mediadores inflamatórios. Essa citocina pode ser sintetizada por diversos tipos celulares incluindo células endoteliais, células do músculo liso vascular, macrófagos e monócitos em resposta a diversos estímulos como aumento nas concentrações de TNF-α e ET-1 (112, 113). Além disso, já foi descrito também que a incubação com noradrenalina em cultura de células de hepatócitos de machos Wistar, induziu aumento na concentração de IL-6 (114), sugerindo que o estímulo de receptores α-adrenérgicos possa ser um dos mecanismos que altere as concentrações dessa citocina.

De fato, em nosso trabalho observamos que a incubação com fenilefrina aumentou a concentração de IL-6 em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR. Entretanto, apenas em aortas isoladas de machos SHR a pré-incubação de DNAmit juntamente com a fenilefrina potencializou esse aumento na concentração de IL-6, o que corrobora com a nossa hipótese de ação diferencial do DNAmit em machos e fêmeas SHR.

Trabalhos já associaram aumento nas concentrações de IL-6 com alterações vasculares. Como exemplo, a pré-incubação com IL-6 aumenta a vasoconstrição induzida pela fenilefrina em aortas de machos Wistar (115) e do músculo liso do corpo cavernoso de ratos Sprague-Dawley, sendo esse último associado ao aumento nas concentrações de TXA_2, um potente vasoconstritor (116).

Portanto, tendo em vista que a IL-6 pode induzir a produção de diversos outros mediadores como o TXA_2, é possível sugerir que em nosso trabalho o aumento nas concentrações de IL-6 após estimulo com DNAmit na presença da fenilefrina seja um dos fatores que justificariam as aortas isoladas de machos SHR apresentarem uma resposta contrátil exacerbada à fenilefrina após estimulo com DNAmit.

Outra citocina importante para a resposta inflamatória é o TNF-α, uma vez que também é capaz de induzir efeitos locais e sistêmicos incluindo a produção de outras moléculas pró-inflamatórias via ativação do NF-κB (112). Esta citocina também pode ser produzida por diversos tipos celulares incluindo células endoteliais, células do músculo liso vascular, macrófagos e células dendríticas (112, 117, 118).

Em nosso trabalho, observamos que apenas em aortas isoladas de machos SHR, a pré-incubação com DNAmit juntamente com a fenilefrina aumentou a concentração de TNF-α. Diferente do ocorrido em aortas de machos, a pré-incubação com DNAmit em aortas isoladas de fêmeas reduziu a concentração de TNF-α à valores menores do que os observados nas fêmeas controles, o que reitera a nossa hipótese de que o DNAmit age de forma distinta em aortas de machos e fêmeas SHR, induzindo provavelmente um cenário mais pró-inflamatório nos machos e mais anti-inflamatório nas fêmeas.

Semelhante a IL-6, trabalhos já associaram aumento nas concentrações de TNF-α com alterações vasculares. Como exemplo, a infusão de TNF-α induziu vasoconstrição coronariana em ratos Wistar (41) e vasoconstrição brônquica em

ovelhas (42), fatos que podem estar associados ao aumento na concentração plasmática de ET-1, um potente vasoconstritor.

Portanto, tendo em vista que o TNF-α também pode induzir a produção de diversos outros mediadores como a ET-1, é possível sugerir que em nosso trabalho o aumento nas concentrações de TNF-α após estimulo com DNAmit na presença da fenilefrina também seja um dos fatores que contribuiriam para as aortas isoladas de machos SHR apresentarem uma resposta contrátil exacerbada à fenilefrina após estimulo com DNAmit.

É importante ressaltar que observamos também que apenas em aortas isoladas de machos SHR a pré-incubação com DNAmit juntamente com a fenilefrina, além de aumentar as concentrações de IL-6 e TNF-α aumentou também as concentrações de IL-10, uma citocina anti-inflamatória capaz de inibir a função de macrófagos ativados e células dendríticas, agindo como *feedback* negativo frente ao desenvolvimento de processo inflamatório (112).

De fato, já foi observado que a infusão de baixas concentrações de IL-6 em homens saudáveis é capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de IL-10 (119). Portanto, é possível que a maior concentração de IL-6 observada em aorta de machos SHR após estímulo com DNAmit juntamente com a fenilefrina, induza também uma maior produção de IL-10 com o objetivo de contrabalancear o aumento na demanda pró-inflamatória após esses estímulos.

O processo inflamatório pode também promover estresse oxidativo, produzindo EROs com a finalidade de eliminar os agentes patogênicos que foram fagocitados, uma vez que essas substâncias são altamente reativas e por oxidação lipídica levam a degradação da membrana plasmática desses microrganismos (112, 120).

Estudos relatam que a ativação do NF-κB pode induzir a produção de EROs por diversos mecanismos, como aumento na expressão das enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase e COX-2 (121). Nesse contexto, o NF-κB é uma das moléculas ativadas na sinalização dos TLRs, portanto, a ativação desses receptores pode também levar a uma maior produção de EROs, fato que é atribuído à sinalização da molécula adaptadora MyD88, ativação da enzima NADPH oxidase e ao estresse mitocondrial (122, 123).

Apesar disso, em nosso trabalho observamos que a pré-incubação com DNAmit não alterou o conteúdo de EROs em aortas isoladas de machos e fêmeas

SHR. Entretanto, observamos que apenas em aortas isoladas de fêmeas SHR, a incubação com fenilefrina aumentou a produção de EROs, sendo que a pré-incubação dessas aortas com o DNAmit impediu esse aumento induzido pela fenilefrina.

É importante destacar que além do processo inflamatório, outros estímulos como o estresse de cisalhamento ou ação de alguns agonistas endoteliais como a bradicinina, também podem induzir a produção de EROs (9). Além disso, já foi descrito em cultura de células endoteliais de aortas isoladas de fêmeas SHR e Wistar que a incubação com fenilefrina aumentou a produção de EROs, indicando que em fêmeas o estímulo de receptores α1-adrenérgicos também induza uma maior produção de EROs (124), o que corrobora com os nossos achados em aortas isoladas de fêmeas SHR após incubação com fenilefrina.

Dentre as EROs uma das principais é o ânion superóxido, uma molécula formada a partir da redução de um elétron do oxigênio molecular pela ação de algumas enzimas como a NADPH oxidase. O ânion superóxido participa de reações de oxidação e redução, podendo reagir rapidamente com o óxido nítrico e levar a formação de peroxinitrito, o que diminui a biodisponibilidade do óxido nítrico e consequentemente seus efeitos vasodilatadores na parede vascular. Dessa forma, as EROs desempenham papel fundamental na função endotelial e nas doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial (9).

Portanto, tendo em vista que em aortas isoladas de fêmeas SHR a pré-incubação com DNAmit impediu o aumento do conteúdo de EROs induzido pela fenilefrina, é possível sugerir que em aortas de fêmeas SHR o DNAmit além de provavelmente induzir um cenário mais anti-inflamatório possa agir também como antioxidante, o que corroboraria com os nossos achados na reatividade vascular e com a nossa hipótese de que o DNAmit age de forma distinta em aortas de machos e fêmeas SHR.

Por fim, é importante ressaltar que a sinalização do TLR9 pode ativar duas vias intracelulares distintas dependendo do tipo de célula onde esse receptor é ativado. Em células imunológicas a ativação do TLR9 está associada com a ativação da via dependente da molécula adaptadora MyD88, envolvendo a ativação de MAPKs e NF-κB e a síntese de diversas moléculas pró-inflamatórias. Por outro lado, em células não imunológicas a ativação do TLR9 está associada com redução na atividade da SERCA2, redução da síntese ATP, ativação da AMPK e maior tolerância ao estresse

celular, o que ocorre de forma independente da ativação de MyD88 (69, 70). Neste contexto, já foi descrito que machos SHR adultos apresentaram maior infiltração de macrófagos no córtex renal em comparação a das fêmeas (125).

Portanto, analisando em conjunto os resultados obtidos em nosso trabalho, é possível sugerir que devido aos maiores valores pressóricos apresentados pelos machos SHR, esses animais apresentem também uma maior infiltração de células imunológicas na parede vascular da aorta em comparação a das fêmeas. Este fato poderia levar a maior ativação de vias intracelulares diferentes do TLR9 após estímulo com DNAmit, ativando principalmente a via clássica (pró-inflamatória) do TLR9 em machos e a via não clássica (maior tolerância ao estresse celular) em fêmeas, o que induziria respostas vasculares diferentes em aortas de machos e fêmeas SHR e corroboraria com os resultados obtidos em nosso trabalho.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que há diferença sexual em relação a liberação do DNA mitocondrial na hipertensão arterial, uma vez que fêmeas SHR apresentaram menor conteúdo de DNA mitocondrial circulante em comparação com o dos machos. Além disso, esse agonista endógeno do TLR9 induziu respostas vasculares diferentes em aortas isoladas de machos e fêmeas SHR, podendo ser este um dos fatores que contribuiria para a diferença sexual na hipertensão arterial. Dessa forma, podemos sugerir que o tratamento similar da hipertensão arterial para homens e mulheres deva ser reavaliado.

REFERÊNCIAS*

1. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VII Diretrize brasileira de hipertensão arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, p. 1-83, 2016.
2. KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia:** bases patológicas das doenças. 7 ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2005. 1592 p.
3. KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K.; HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, p. 217-223, 2005.
4. AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart Disease and Stroke Statistics - 2015 Update. **Circulation**, v. 131, p. e29-e322, 2015.
5. BUBB, K. J.; KHAMBATA, R. S.; AHLUWALIA, A. Sexual dimorphism in rodent models of hypertension and atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, p. 298-312, 2012.
6. DANTAS, A. P.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; COSTA, S. G.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H. C. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 39, p. 405–411, 2002.
7. YANES, L. L.; RECKELHOFF, J. F. Postmenopausal Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 27, p. 1-18, 2011.
8. AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2012. 1335 p.
9. KRIEGER, J. E. **Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares**: A integração entre a pesquisa e a prática clínica. São Paulo: Atheneu, 2008. 600 p.
10. CURI, R.; PROCOPIO, J. **Fisiologia Básica**. 1 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2009. 857 p.
11. CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. C. A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 76-88, 2001.
12. MELO, S. E. S. F. C.; YUGAR-TOLEDO, J. C.; COCA, A. P.; JÚNIOR, H. M. Hipertensão arterial, aterosclerose e inflamação: o endotélio como órgão-alvo. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 14, p. 234-238, 2007.
13. FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wigger Award Lecture). **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, p. H985-1002, 2006.
14. LUZ, P. L.; LIBBY, P.; CHAGAS, A. C. P.; LAURINDO, F. R. M. **Endotélio e Doenças Cardiovasculares – Biologia Vascular e Síndromes Clínicas**. 1 ed. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu, 2016. 900 p.
15. KAUSER, K.; RUBANYI, G. M. Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 25, p. 517-523, 1995.

***** De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

16. LORIA, A. S.; BRINSON, K. N.; FOX, B. M.; SULLIVAN, J. C. Sex-specific alterations in NOS regulation of vascular function in aorta and mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats compared to Wistar Kyoto rats. **Physiological Reports**, v. 2, p. 1-14, 2014.

17. DANTAS, A. P.; FRANCO, M. do C.; SILVA-ANTONIALLI, M. M.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. **Cardiovascular Research**, v. 61, p. 22-29, 2004.

18. KNOT, H. J.; LOUNSBURY, K. M.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Gender differences in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial Ca2+ and ecNOS activity. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. H961-H969, 1999.

19. ADDIS, R.; CAMPESI, I.; FOIS, M.; CAPOBIANCO, G.; DESSOLE, S.; FENU, G.; MONTELLA,A.; CATTANEO, M. G.; VICENTINI, L. M.; FRANCONI, F. Human umbilical endothelial cells (HUVECs) have a sex: characterisation of the phenotype of male and female cells. **Biology of Sex Differences**, v. 5, p. 1-12, 2014.

20. SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 539-552, 2009.

21. RIDKER, P. M.; HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E.; RIFAI, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 836-843, 2000.

22. RAMJI, D. P.; DAVIES, T. S. Cytokines in atherosclerosis: key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. **Cytokines and Growth Factores Reviews**, v. 26, p. 673-685, 2015.

23. Miller, F. J.; Sharp, W. J.; Fang, X.; Oberley, L. W.; Oberley, T. D.; Weintraub, N. L. Oxidative Stress in Human Abdominal Aortic Aneurysms A Potential Mediator of Aneurysmal Remodeling. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p. 560-565, 2002.

24. OIKONOMOU, E.; TOUSOULIS, D.; SIASOS, G.; ZAROMITIDOU, M.; PAPAVASSILIOU, A. G.; STEFANADIS, C. The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches. **Hellenic Journal of Cardiology**, v. 52, p. 30-40, 2011.

25. ELSTER, S. K.; BRAUNWALD, E.; WOOD, H. F. A study of C-reactive protein in the serum of patients with congestive heart failure. **American Heart Journal**, v. 51, p. 533-541, 1956.

26. LEVINE, B.; KALMAN, J.; MAYER, L.; FILLIT, H. M.; PACKER, M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 236-241, 1990.

27. SATOKAWA, H.; HOSHINO, S.; IGARI, T.; IWAYA, F.; MIDORIKAWA, H. The appearance of cytokines and adhesion molecules in saphenous vein valves in chronic venous insufficiency. **Phlebology**, v. 16, p. 106–110, 2002.

28. SANZ-ROSA, D.; OUBIÑA, M. P.; CEDIEL, E.; LAS HERAS, N.; VEGAZO, O.; JIMÉNEZ, J.; LAHERA, V.; CACHOFEIRO, V. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. **American**

Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, v. 288, p. H111-H115, 2005.

29. BAUTISTA, L. E.; LÓPEZ-JARAMILLO, P.; VERA, L. M.; CASAS, J. P.; OTERO, A. P.; GUARACAO, A. I. Is C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension? **Journal of Hypertension**, v. 19, p. 857-861, 2001.
30. SESSO, H. D.; BURING, J. E.; RIFAI, N.; BLAKE, G. J.; GAZIANO, J. M.; RIDKER, P. M. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. **Journal of the American Medical Association**, v. 290, p. 2945-2951, 2003.
31. BOMFIM, G. F.; ECHEM, C.; MARTINS, C. B.; COSTA, T. J.; SARTORETTO, S. M.; DOSSANTOS, R. A.; OLIVEIRA, M. A.; AKAMINE, Z. B.; TOSTES, R. C.; WEBB, R. C.; CARVALHO, M. H. C. Toll-like receptor 4 inhibition reduces vascular inflammation in spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 122, p. 1-7, 2015.
32. POCKLEY, A. G.; WU, R.; LEMNE, C.; KIESSLING, R.; FAIRE, U.; FROSTEGARD, J. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. **Hypertension**, v. 36, p. 303-307, 2000.
33. ZHOU, J.; ANDO, H.; MACOVA, M.; DOU, J.; SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 25, p. 878-886, 2005.
34. WONG, M. S. K.; DELANSORNE, R.; MAN, R. Y. K.; SVENNINGSEN, P.; VANHOUTTE, P. M. Chronic treatment with vitamin D lowers arterial blood pressure and reduces endothelium-dependent contraction in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 299, p. H1226-H1234, 2010.
35. VILA, E.; SALAICES, M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. **American Journal of Physiology Heart Physiology**, v. 288, p. 1016-1021, 2005.
36. DINH, Q. N.; DRUMMOND, G. R.; SOBEY, C. G.; CHRISSOBOLIS, S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, p. 1-11, 2014.
37. HEIN, T. W.; SINGH, U.; VASQUEZ-VIVAR, J.; DEVARAJ, S.; KUO, L.; JIALAL, I. Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in-vivo. **Atherosclerosis**, v. 206, p. 61–68, 2009.
38. VERMA, S.; WANG, C-H.; LI, S-H.; DUMONT, A. S.; FEDAK, P. W. M.; BADIWALA, M. V.; DHILLON, B., WEISEL, R. D.; LI, R-K.; MICKLE, D. A. G.; STEWART, D. J. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. **Circulation**, v. 106, p. r28-r34, 2002.
39. TEIXEIRA, B. C.; LOPES, A. L.; MACEDO, R. C. O.; CORREA, C. S.; RAMIS, T. R.; RIBEIRO, J. L.; REISCHAK-OLIVEIRA, A. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, p. 108-115, 2014.
40. CORDER, R.; CARRIER, M.; KHAN, N.; KLEMM, P.; VANE, J. R. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. Journal of Cardiovascular Pharmacology, v. 26, p. S56–S58, 1995.
41. KLEMM, P.; WARNER, T. D.; HOHLFELD, T.; CORDER, R.; VANE, J. R. Endothelin 1 mediates ex vivo coronary vasoconstriction caused by exogenous

and endogenous cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 2691-2695, 1995.

42. WAGNER, E. M. TNF-α induced bronchial vasoconstriction. **The American Journal of Physiology - Heart *and* Circulatory Physiology**, v. 279, p. H946–H951, 2000.
43. SHAHID, M.; FRANCIS, J.; MAJID, D. S. A. Tumor necrosis factor α induces renal vasoconstriction as well as natriuresis in mice. ***The* American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 295, p. F1836–F1844, 2008.
44. JIANG, B.; LIAO, R. The paradoxical role of inflammation in cardiac repair and regeneration. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 3, p. 410-416, 2010.
45. EMING, S. A.; HAMMERSCHMIDT, M.; KRIEG, T.; ROERS, A. Interrelation of immunity and tissue repair of regeneration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 517-527, 2009.
46. BOMFIM, G. F.; RODRIGUES, F. L.; CARNEIRO, F. S. Are the innate and adaptive imune system setting hypertension on fire?. **Pharmacological Research**, v. 117, p. 377-393, 2017.
47. DASARI, P.; NICHOLSON, I. C.; HODGE, G.; DANDIE, G. W.; ZOLA, H. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. **Cellular Immunology**, v. 236, p. 140-145, 2005.
48. KABELITZ, D. Expression and function of toll-like receptors in T lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 39-45, 2007.
49. BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signaling. Nature, v. 430, p. 257-263, 2004.
50. GOULOPOULOU, S.; McCARTHY, C. G.; WEBB, R. C. Toll-like receptors in the vascular system: sensing the dangers within. **Pharmacological Reviews**, v. 68, p. 142-167, 2016.
51. MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, p. 301-305, 2002.
52. LIU, N.; LIU, J. T.; JI, Y. Y.; LU, P. P. C-reactive protein triggers inflammatory responses partly via TLR4/IRF3/NF-Kb signaling pathway in rat vascular smooth muscle cells. **Life Sciences**, v. 87, p. 367-374, 2010.
53. JI, Y.; LIU, J.; WANG, Z.; LIU, N. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 23, p. 265-276, 2009.
54. GRAAF, R.; KLOPPENBURG, G.; KITSLAAR, P. J.; BRUGGEMAN, C. A.; STASSEN, F. Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1859-1865, 2006.
55. ASEA, A.; REHLI, M.; KABINGU, E.; BOCH, J. A.; BARE, O.; AURON, P. E.; STEVENSON, M. A.; CALDERWOOD, S. K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 15028-15034, 2002.
56. SCHULTZ, K.; MURTHY, V.; TATRO, J. B.; BEASLEY, D. Endogenous interleukin-1 promotes a proliferative and proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cells. **The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, p. H2927–H2934, 2007.
57. SANDRI, S.; RODRIGUEZ, D.; GOMES, E.; MONTEIRO, H. P.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Is serum amyloid A endogenous TLR4 agonist? **Journal of Leukocyte**. Biology, v. 83, p. 1174-1180, 2008.

58. LI, T.; WANG, Y.; LIU, C.; HU, Y.; WU, M.; LI, J.; GUO, L.; CHEN, L.; CHEN, Q.; HA, T.; LI, C.; LI, Y. MyD88-dependent nuclear factor-kappaB activation is involved in fibrinogen-induced hypertrophic response of cardiomyocytes. **Journal of Hypertension**, v. 27, p. 1084-1093, 2009.
59. BAE, Y. S.; LEE, J. H.; CHOI, S. H.; KIM, S.; ALMAZAN, F.; WITZTUM, J. L.; MILLER, Y. I. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized LDL: TLR4- and Syk-dependent activation of Nox2. **Circulation Research**, v. 104, p. 210-218, 2009.
60. MUTO, J.; YAMASAKI, K.; TAYLOR, K. R.; GALLO, R. L. Engagement of CD44 by hyaluronan suppresses TLR4 signaling and the septic response to LPS. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 449–456, 2009.
61. LIU-BRYAN, R.; SCOTT, P.; SYDLASKE, A.; ROSE, D. M.; TERKELTAUB, R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. **Arthritis & Rheumatology**, v. 52, p. 2936–2946, 2005.
62. BOMFIM, G. F.; TOSTES, R.; FORTES, Z.; CARVALHO, M. H. C. Role of TLR4 expression in experimental hypertension. **FASEB Journal**, v. 24, 2010.
63. BOMFIM, G. F.; DOSSANTOS, R. A.; OLIVEIRA, M. A.; GIACHINI, F. R.; AKAMINE, E. H.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; WEBB, R. C.; CARVALHO, M. H. C. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. **Clinical Science**, v. 122, p. 535–543, 2012.

64. ECHEM, C.; BOMFIM, G. F.; CERAVOLO, G. S.; OLIVEIRA, M. A.; SANTOS-EICHLER, R. A.; BECHARA, L. R.; VERAS, M. M.; SALDIVA, P. H. N.; FERREIRA, J. C.; AKAMINE, E. H.; FORTES, Z. B.; DANTAS, A. P.; CARVALHO, M. H. C. Anti-toll like receptor 4 (TLR4) therapy diminishes cardiac remodeling regardless of changes in blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). **International Journal of Cardiology**, v. 187, p. 243-245, 2015.
65. DENNISON, U.; McKERNAN, D. P.; SCULLY, P.; CLARKE, G.; CRYAN, J.; DINAN, T. Menstrual cycle influences Toll-like receptor responses. **Neuroimmunomodulation**, v. 19, p. 171-179, 2012.
66. SALES, M. L.; SCHREIBER, R.; FERREIRA-SAE, M. C.; FERNANDES, M. N.; PIVETA, C.; CIPOLLI, J. A.; CALIXTO, A.; MATOS-SOUZA, J. R.; GELONEZE, B.; FRANCHINI, K. G.; NADRUZ, W. Jr. The functional Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with lower left ventricular mass in hypertensive women. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 744-748, 2010.
67. RODRIGUES, F. L.; SILVA, L. E. V.; HOTT, S. C.; BOMFIM, G. F.; SILVA, C. A. A.; FAZAN Jr, R.; RESSTEL, L. B. M.; TOSTES, R. C.; CARNEIRO, F. S. Toll-like receptor 9 plays a key role in the autonomic cardiac and baroreflex control of arterial pressure. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, p. R714-R723, 2015.
68. LATZ, E.; SCHOENEMEYER, A.; VISINTIN, A.; FITZGERALD, K. A.; MONKS, B. G.; KNETTER, C. F.; LIEN, E.; NILSEN, N. J.; ESPEVIK, T.; GOLENBOCK, D. T. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. **Nature Immunology**, v. 5, p. 190-198, 2004.
69. SHINTANI, Y.; KAPOOR, A.; KANEKO, M.;SMOLENSKI, R. T.; D'ACQUISTO, F.; COPPEN, S. R.; HARADA-SHOJI, N.; LEE, H. J.; THIEMERMANN, C.;

TAKASHIMA, S.; YASHIRO, K.; SUZUKI, K. TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 5109-2114, 2013.

70. SHINTANI, Y.; DREXLER, H. C. A.; KIOKA, H.; TERRACCIANO, C. M. N.; COPPEN, S. R.; IMAMURA, H.; AKAO, M.; NAKAI, J.; WHEELER, A. P.; HIGO, S.; NAKAYAMA, H.; TAKASHIMA, S.; YASHIRO, K.; SUZUKI, K. Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2. **EMBO Reports**, v. 15, p. 438-445, 2014.
71. GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. Mitochondrial evolution. **Science**, v. 283, p. 1476-1481, 1999.
72. ZHANG, Q.; RAOOF, M.; CHEN, Y.; SUMI, Y.; SURSAL, T.; JUNGER W.; BROHI, K.; ITAGAKI, K.; HAUSER, C. J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v. 464, p. 104-107, 2010.
73. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia Molecular da Célula. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1396 p.
74. BAINES, C. P. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. **Frontiers in Physiology**, v. 1, p. 1-8, 2010.
75. WENCESLAU, C. F.; McCARTHY, C. G.; SZASZ T.; SPITLER, K.; GOULOPOULOU, S.; WEBB, R. C. Mitochondrial damage-associated molecular patterns and vascular function. **European Heart Journal**, v. 35, p. 1172-1177, 2014.
76. LAU, S. Y.; BARRETT, C. J.; GUILD, S-J.; CHAMLEY, L. W. Necrotic trophoblast debris increases blood pressure during pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 97, p. 175-182, 2013.
77. REVIS, N. W.; CAMERON, A. J. Association of myocardial cell necrosis with experimental cardiac hypertrophy. **The Journal of Pathology**, v. 128, p. 193-202, 1979.
78. OKOSHI, M. P.; MATSUBARA, L. S.; FRANCO, M.; CICOGNA, A. C.; MATSUBARA, B. B. Myocyte necrosis in the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 1135-1144, 1997.
79. THOMPSON, P. L.; FLETCHER, E. E.; KATAVATIS, V. Enzymatic indices of myocardial necrosis: influence on short- and long- prognosis after myocardial infarction. **Circulation**, v. 59, p. 113-119, 1979.
80. MARTINET, W.; SCHRIJVERS, D. M.; De MEYER, G. R. Necrotic cell death in atherosclerosis. **Basic Research in Cardiology**, v. 106, p. 749-760, 2011.
81. YUAN, J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. **Apoptosis**, v. 14, p. 469-477, 2009.
82. NAKAYAMA, H.; CHEN, X.; BAINES, C. P.; KLEVITSKY, R.; ZHANG, H.; JALEEL, N.; CHUA, B. H.; HEWETT, T. E.; RABBINS, J.; HOUSER, S. R.; MOLKENTIN, J. D. Ca2+- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 2431-2444, 2007.
83. KNUFMAN, N. M.; VAN DER LAARSE, A.; VLIEGEN, H. W.; BRINKMAN, C. J. Quantification of myocardial necrosis and cardiac hypertrophy in isoproterenol-treated rats. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 57, p. 15-32, 1987.

84. CHOI, K.; KIM, J.; KIM, G. W.; CHOI, C. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondira-dependent burst of reactive oxygen species. **Current Neurovascular Research**, v. 6, p. 213-222, 2009.
85. CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 323-333, 2000.
86. SAMALI, A.; NORDGREN, H.; ZHIVOTOVSKY, B.; PETERSON, E.; ORRENIUS, S. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255, p. 6-11, 1999.
87. SALDEEN, J. Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. **Endocrinology**, v. 141, p. 2003-2010, 2000.
88. QIU, C.; HEVNER, K.; ENQUOBAHRIE, D. A.; WILLIAMS, M. A. A case-control study of maternal blood mitochondrial DNA copy number and preeclampsia risk. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 3, p. 237-244, 2012.
89. WILLIAMS, M. A.; SANCHEZ, S. E.; ANANTH, C. V.; HEVNER, K.; QIU, C.; ENQUOBAHRIE, D. A. Maternal blood mitochondrial DNA copy number and placental abruption risk: results from a preliminary study. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 4, p. 120-127, 2013.
90. GOULOPOULOU, S.; MATSUMOTO, T.; BOMFIM, G. F.; WEBB, R. C. Toll-like receptor 9 activation: a novel mechanism linking placenta-derived mitochondrial DNA and vascular dysfunction in preeclampsia. **Clinical Science**, v. 123, p. 429-435, 2012.
91. GOULOPOULOU, S.; WENCESLAU, C. F.; McCARTHY, C. G.; MATSUMOTO, T.; WEBB, R. C. Exposure to stimulatory CpG oligonucleotides during gestation induces maternal hypertension and excess vasoconstricton in pregnant rats. **The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 310, p. H1015-H1025, 2016.
92. VEIKO, N. N.; KONOROVA, I. L.; NEVEROVA, M. E.; FIDELINA, O. V.; MKRTUMOVA, N. A.; ERSHOVA, E. S.; KONKOVA, M. S.; POSTNOV, A. Delayed appearance of hypertension in spontaneously hypertensive rat (SHR) injected with CpG-rich DNA early in ontogenesis. **Biomed Khim**, v. 56, p. 686-699, 2010.
93. VILELA, M. G.; JÚNIOS, J. L. S.; SILVA, J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **FEMINA**, v. 35, p. 667-670, 2007.
94. CARVALHO, M. H. C.; SCIVOLETTO, R.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D.; CORDELLINI, S. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. **Journal of Hypertension**, v. 5, p. 377-382, 1987.
95. McCARTHY, C. G.; WENCESLAU, C. F.; GOULOPOULOU, S.; OGBI, S.; BABAN, B.; SULLIVAN, J. C.; MATSUMOTO, T.; WEBB, R. C. Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **Cardiovascular Research**, v. 107, p. 119-130, 2015.
96. GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12 ed. Nova York: McGraw-Hill, 2011. 2084 p.
97. CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 417-423, 2002.

98. BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; NETO, M. A.; BENDHACK, L. M. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, p. 287-295, 2008.
99. FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 358, p. 113-122, 1998.
100. DINIZ, M. C.; OLIVON, V. C.; TAVARES, L. D.; SIMPLICIO, J. A.; GONZAGA, N. A.; DE SOUZA, D. G.; BENDHACK, L. M.; TIRAPELLI, C. R.; BONAVENTURA, D. Mechanisms underlying sodium nitroprusside-induced tolerance in the mouse aorta: Role of ROS and cyclooxygenase-derived prostanoids. **Life Sciences**, v. 176, p. 26-34, 2017.
101. ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Interleukin-6 impairs endothelium-dependent NO-cGMP-mediated relaxion and enhances contraction in systemic vessels of pregnant rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, p. R1013-R1023, 2004.
102. DAVIS, J. R.; GIARDINA, J. B.; GREEN, G. M.; ALEXANDER, B. T.; GRANGER, J. P.; KHALIL, R. A. Reduced endothelial NO-cGMP vascular relaxion pathway durinf TNF-α-induced hypertension in pregnant rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, p. R390-R399, 2002.
103. FORTES, Z. B.; LEME, J. G.; SCIVOLETTO, R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endotelial cell. **British Journal of Pharmacology**, v. 79, p. 771-781, 1983.
104. FRANTZ, S.; KOBZIK, L.; KIM, Y-D.; FUKAZAWA, R.; MEDZHIYOV, R.; LEE, R. T.; KELLY, R. A. Toll 4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, p. 271-280, 1999.
105. EWALD, S. E.; LEE, B. L.; LAU, L.; WICKLIFFE, K. E.; SHI, G-P.; CHAPMAN, H. A.; BARTON, G. M. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. **Nature**, v. 456, p. 658-662, 2008.
106. PARK, B.; BRINKMANN, M. M.; SPOONER, E.; LEE, C. C.; KIM, Y. M.; PLOEGH, H. L. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. **Nature Immunology**, v. 9, p. 1407-1417, 2008.
107. ROBERTS, R. E. Role of the extracelular signal-regulated kinase (ERK) signal transduction cascade in α2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in porcine palmar lateral vein. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 859-866, 2001.
108. ROBERTS, R. E. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway: a potential therapeutic target in hypertension. **Journal of Experimental Phermacology**, v. 4, p. 77-83, 2012.
109. DESSY, C.; KIM, I.; SOUGNEZ, C. L.; LAPORTE, R.; MORGAN, K. G. A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. C1081-C1086, 1998.
110. ROBERTS, R. E. The role of Rho kinase and extracelular regulated kinase-mitogen-activated protein kinase in α2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the porcine palmar lateral vein. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, p. 742-747, 2004.

111. ARTHUR, J. S. C.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 679-692, 2013.
112. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592 p.
113. HAN, J. H.; LEE, M. Y.; MYUNG, S. C. The effect of endothelin-1 on the production of interleukin-6 in cultured human detrusor smooth mucle cells, and the effect of interleukin-6 on the contractile response of bladder smooth muscle strips from rats. **BJU International**, v. 104, p. 707-712, 2009.
114. JUNG, B. D.; KIMURA, K.; KITAMURA, H.; MAKONDO, K.; OKITA, K.; KAWASAKI, M.; SAITO, M. Norepinephrine stimulates interleukin-6 mRNA expression in primary cultured rat hepatocytes. **The Journal of Biochemistry**, v. 127, p. 205-209, 2000.
115. TANG, W-B.; ZHOU, Y-Q.; ZHAO, T.; SHAN, J-L.; SUN, P.; YANG, T-T.; CHANG, X-W.; LI, S.; WANG, P. S.; XIE, D-P. Effect of interleukin-6 (IL-6) on the vascular smooth muscle contraction in abdominal aorta of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Chinese Journal of Physiology**, v. 54, p. 318-323, 2011.
116. MYUNG, S. C.; HAN, J. H.; SONG, K. K.; KANG, G. H.; LEE, S. Y.; KIM, T. H.; LEE, M. Y.; KIM, H. W.; KIM, S-C. The effects of interleukin-6 on the contraction and relaxion responses of the cavernous smooth muscle from rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 589, p. 228-232, 2008.
117. RANTA, V.; ORPANA, A.; CARPÉN, O.; TURPEINEN, U.; YLIKORKALA, O.; VIINIKKA, L. Human vascular endothelial cells produce tumor necrosis factor-alpha in response to proinflammatory cytokine stimulation. **Critical Care Medicine**, v. 27, p. 2184-2187, 1999.
118. DETMER, K.; WANG, Z.; WAREJCKA, D.; LEEPER-WOODFORD, S. K.; NEWMAN, W. H. Endotoxin stimulated cytokine production in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, p. H661-H668, 2001.
119. STEENSBERG, A.; FISCHER, C. P.; KELLER, C.; MOLLER, K.; PEDERSEN, B. K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10 and cortisol in humans. **American Journal of Physiology – Endocrinology ans Metabolism**, v. 285, p. E433-E437, 2003.
120. DINH, Q. N.; DRUMMOND, G. R.; SOBEY, C. G.; CHRISSOBOLIS, S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. **BioMed Research Internation**, v. 2014, p. 1-11, 2014.
121. MORGAN, M. J.; LIU, Z-G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-Kb signaling. **Cell Research**, v. 21, p. 103-115, 2011.
122. KOHCHI, C.; INAGAWA, H.; NISHIZAWA, T.; SOMA, G-I. ROS ans innate immunity. **Anticancer Research**, v. 29, p. 817-821, 2009.
123. WEST, A. P.; BRODSKY, I. E.; RAHNER, C.; WOO, D. K.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; WALSH, M. C.; CHOI, Y.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. TLR signaling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature**, v. 472, p. 476-480, 2011.
124. ZANCHETA, D.; TROIANO, J. A.; POTJE, S. R.; CAVALARI, P.; SUMIDA, D. H.; ANTONIALI, C. The PI3K-Akt-eNOS pathway is involved in aortic hyporeactivity to phenylephrine associated with late pregnancy is spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 122, p. 78-86, 2015.
125. SULLIVAN, J. C.; SEMPRUN-PRIETO, L.; BOESEN, E. I.; POLLOCK, D. M.; POLLOCK, J. S. Sex and sex hormones influence the development of

albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, p. R1573-R1579, 2007.