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

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 (DNAmít) 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 DNAmít, 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 DNAmít 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 DNAmít 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 DNAmít 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 DNAmít 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 DNAmít 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 DNAmít 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 DNAmít 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.

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 amiloide 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-1 β) 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-1 β , 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: ciclooxygenase; COX-2: ciclooxygenase 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; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; iNOS: óxido nítrico-sintase induzível; NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; O₂⁻: ânion superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; PGE₂: prostaglandina E₂; PGH₂: prostaglandina H₂; PGI₂: prostaciclina; Pre-pro ET: pré-pró endotelina; SMC: célula do músculo liso vascular; SOD: superóxido dismutase; TXA₂: 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-1 β 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; hTLR8: 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 *Trypanosoma cruzi* ligante de mucina ancorada ao glicofosfatidilinositol; 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- κ B: 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- κ B, 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- κ B 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-1 α , 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 (DNAmít) 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 DNAmít e sendo essa umas das principais fontes de DNAmít 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-1 β , 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 DNAmít 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 DNAmít circulante. De fato, foi demonstrado que há aumento de DNAmít 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 DNAmít circulante maior o risco de deslocamento da placenta e nascimento prematuro (89).

Em fêmeas prenhes Wistar, a administração de DNAmít 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 TXA₂), 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.

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 Diretriz 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 eNOS 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 Factors 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.; PAPAVALASSILIOU, 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.; CHRISOBOLOS, 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 immune 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-K κ B 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. EICHEM, 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.; CICOONA, 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.; MOKKENTIN, 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 mitochondria-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 vasoconstriction 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.