

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS
VASCULARES DE AORTA DE RATOS ESTIMULADAS POR
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Felipe Bichi Strela

Dissertação de Mestrado Em Ciências Fisiológicas

**Programa De Pós-Graduação Em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal Do Espírito Santo
Vitória, Agosto de 2018**

Strela, Felipe Bichi, 1993

Avaliação fenotípica de células musculares lisas vasculares de aorta de ratos estimuladas por lipopolissacarídeo. Vitória, 2018

xii, 63p., 29,7cm (M.Sc., Ciências Fisiológicas, 2018)

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof^a Dr^a Paula Frizera Vassallo

1. Células Musculares Lisas Vasculares 2. LPS 3. Migração Celular 4. Contração celular.

Aos meus pais, Alberto (in memoriam) e Ivanete.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas dificuldades, que são fonte de crescimento e aprendizado, e pelas bênçãos.

Aos meus pais pela educação, valores e princípios que me foram passados.

A minhas irmãs Delisete e Nara, por todas as palavras de incentivo.

A minha esposa Patricia, por sua paciência, companheirismo e amor.

A Prof^ª. Dr^ª. Paula Frizera Vassallo, por ter me aceito como aluno, por ter me ajudado no período do mestrado, além do que é dever de um orientador, e por ser um exemplo de integridade.

Ao Prof. Dr. Valério Garrone Barauna, pelas inúmeras contribuições no meu projeto, pela oportunidade de visitar a USP, e por sua disponibilidade constante.

Aos professores do LEMC/PPGCF pelos ensinamentos.

A Dr^ª. Rebeca Caldeira Machado pela ajuda nos experimentos, incentivo para o simpósio de sepse e pelas palavras de fé.

A Bruna Brun pelos ensinamentos sobre cultura de células, pela parceria nos experimentos e momentos de descontração.

A Bianca pelos ensinamentos sobre cultura de células.

Aos alunos do LEMC, pelos ótimos momentos de confraternização.

Aos mestrandos ingressantes em 2016, pela receptividade e companheirismo.

Aos alunos Vitão, Randri, Dieni, Bruna Coelho e Michely, Prof^ª Livia e Prof^ª. Ana Paula pela simpatia e receptividade.

Ao Prof. Dr. Daniel Claudio de Oliveira Gomes, por permitir o uso de seu laboratório.

A Glênia Daros Sarnágli, pelos experimentos de ELISA e pela amizade.

Aos demais alunos do Laboratório de Imunologia/NDI, pelo acolhimento nos dias de experimento.

A Prof^ª Dr^ª Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni, por ter me permitido usar a sala cultura de células.

A Cynara Oliveira Possamai e ao Steven Rios Ribeiro, por toda ajuda no uso da sala de cultura de células.

Ao Dr. Anderson Almeida pelos cafés filosóficos.

Aos demais funcionários da UFES.

As agências de fomento, CAPES e FAPES.

Obrigado por tudo.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE | 13 |
| 1.2 SEPSE E EVENTOS CARDIOVASCULARES..... | 16 |
| 1.3 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE..... | 17 |
| 1.3.1 Alterações vasculares na sepse | 22 |
| 1.4. TLR4 E DOENÇAS CARDIOVASCULARES | 24 |
| 1.5 CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES..... | 24 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 28 |
| 3 OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 29 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 29 |
| 4 METODOLOGIA | 30 |
| 4.1 CULTURA DE CÉLULAS | 30 |
| 4.2 IMUNOFLOURESCÊNCIA | 31 |
| 4.3 MIGRAÇÃO CELULAR | 32 |
| 4.4 CONTRAÇÃO CELULAR | 34 |
| 4.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO..... | 35 |
| 4.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE CAPTURA (ELISA) | 36 |
| 4.7 VIABILIDADE CELULAR..... | 37 |
| 4.8 APOPTOSE E NECROSE CELULAR | 37 |
| 4.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR) | 38 |
| 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 40 |
| 5 RESULTADOS | 41 |
| 5.1 VIABILIDADE CELULAR..... | 41 |
| 5.2 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO GÊNICA DOS PERFIS CONTRÁTIL/SECRETÓRIO DA CMLVs PELO ESTÍMULO COM LPS | 42 |
| 5.3 PRODUÇÃO CELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO PELAS CMLVs ESTIMULADAS POR LPS | 44 |
| 5.4 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS FENÓTIPOS MIGRATÓRIO E CONTRÁTIL DAS CMLVs PELA ESTIMULAÇÃO AGUDA COM LPS..... | 45 |
| 6 DISCUSSÃO | 51 |
| 7 CONCLUSÃO | 58 |
| REFERÊNCIAS | 60 |
| ANEXO I – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados na RT-PCR..... | 30 |
|--|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Mortalidade média anual e número de pacientes com sepse de 2000 a 2012 na Austrália e Nova Zelândia..... | 15 |
| Figura 2: Curvas de sobrevivência de pacientes que tiveram alta pós sepse e de pacientes que tiveram alta após outras patologias (população controle)..... | 16 |
| Figura 3: Visão geral da resposta inflamatória da sepse..... | 18 |
| Figura 4: Representação dos PAMPs DAMPS e PRRs..... | 19 |
| Figura 5: Representação do LPS e sua localização na membrana externa na <i>E. coli</i> | 21 |
| Figura 6: Modelo da dinâmica do citoesqueleto na contração de CMLVs..... | 25 |
| Figura 7: Mecanismo de migração celular..... | 26 |
| Figura 8: Imunofluorescência das CMLVs..... | 32 |
| Figura 9: Ensaio de migração por Wound-Healing..... | 34 |
| Figura 10: Efeito do LPS na expressão gênica de TLR4 das CMLVs..... | 41 |
| Figura 11: Mortalidade das CMLVs pelo azul de tripan..... | 41 |
| Figura 12: Viabilidade das CMLVs..... | 42 |
| Figura 13: Efeito do LPS na expressão gênica de marcadores de perfis fenotípicos por CMLVs..... | 43 |
| Figura 14: Efeito do LPS na expressão gênica de citocinas inflamatórias por CMLVs..... | 43 |
| Figura 15: Efeito do LPS na produção de IL-6 pelas CMLVs..... | 44 |
| Figura 16: Efeito do LPS na produção de NO pelas CMLVs..... | 45 |
| Figura 17: Efeitos do estímulo agudo com LPS em CMLVs..... | 46 |
| Figura 18: Ação da aminoguanidina na estimulação aguda de CMLVs com LPS..... | 47 |
| Figura 19: Efeitos do pré-condicionamento com LPS em CMLVs..... | 48 |
| Figura 20: Ação do tocilizumabe no pré-condicionamento de CMLVs com LPS..... | 50 |
| Figura 21: Modelo hipotético representativo da ação do LPS em CMLVs..... | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AMINOG – aminoguanidina

CD14 - grupo de diferenciação 14

CMLVs - células musculares lisas vasculares

DAMPs - padrões moleculares associados a danos

DNA - ácido desoxirribonucleico

EPM - erro padrão da média

HMGB1 - proteína B1 do grupo de alta mobilidade

IL-1 β - interleucina 1 beta

IL-6 – interleucina 6

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

KCl - cloreto de potássio

LBP - proteína de ligação ao LPS

LPS - lipopolissacarídeo

MCP-1 - proteína quimiotática de monócitos 1

MD2 - fator de diferenciação mieloide

MyD88 - gene de resposta primária de diferenciação mieloide

NO - óxido nítrico

NOD-LRRs - domínios de oligomerização de nucleotídeos ricos em repetição de leucina

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos

PRRs - receptores de imunidade inata reconhecedores de padrões

RLHs - helicases do tipo RIG-I

SFB - soro fetal bovino

SM22 α - proteína de músculo liso 22 α

STFS - solução tampão fosfato-salina

TLR4 - receptores do tipo *Toll* 4

TLRs - receptores do tipo *Toll*

TNF α - fator de necrose tumoral alfa

TOCI - tocilizumabe

TRIF - indutor de Interferon- β contendo domínio TIR

RESUMO

Introdução: A sepse é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. Apresenta incidência e número de sobreviventes crescentes nas últimas duas décadas, sendo que estes sobreviventes apresentam risco elevado de desenvolver complicações, como eventos cardiovasculares, e mortalidade aumentada nos anos subsequentes a sepse. O lipopolissacarídeo (LPS) ativa os receptores do tipo toll 4 (TLR4), contribuindo para a resposta inflamatória na sepse. O TLR4 é também expresso em células musculares lisas vasculares (CMLVs), podendo modular o perfil fenotípico destas, e, cooperar para a fisiopatologia da sepse e alterações cardiovasculares no pós sepse. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da estimulação com LPS sobre diferentes fenótipos de CMLVs, em cultura. **Métodos:** CMLVs primárias de aorta de ratos Wistar foram incubadas com LPS (1µg/mL) em diferentes protocolos experimentais. Duas condições de incubação foram usadas nos ensaios de contração e migração celulares: (1) estimulação aguda: estímulo iniciado nos ensaios; (2) Pré-condicionamento: estimulação por 24 ou 48 horas e retirada do estímulo nos ensaios. A Migração e contração celulares foram avaliadas utilizando os métodos de *wound-healing* e contração em gel de colágeno, respectivamente. Foram avaliadas também, a produção de óxido nítrico pela reação de Griess, a expressão gênica de citocinas, vimentina, colágeno e SM-22α, por RT-PCR, e a produção de IL-6 por ELISA. **Resultados:** A incubação com LPS por 6 horas aumentou a expressão de citocinas (IL-1β: 794%, IL-6: 2310%, TNFα: 380%, MCP-1: 99%), e por 24 horas aumentou a expressão gênica de marcadores de fenótipo secretório (colágeno: 27%, vimentina: 29%), e SM22α (53%), molécula relacionada com migração e contração celular. O LPS aumentou a secreção de IL-6 após 24 horas (487%) e 48 horas (418%), e de NO após 8 horas (8%) e 24 horas (52%), aumentos estes na produção de NO revertidos pela aminoguanidina (inibidor da iNOS). A estimulação aguda com LPS reduziu a migração (-20%) e a contração (-38%), achados revertidos pela aminoguanidina. O pré-condicionamento com LPS aumentou a migração (16%) e a contração (154%) das CMLVs, achados estes revertidos com tocilizumabe (inibidor do receptor de IL-6). **Conclusão:** O LPS exerce efeitos modulando os fenótipos secretório, contrátil e migratório. A estimulação

aguda com LPS promoveu redução, dependente do óxido nítrico, da resposta migratória e contrátil, sugerindo que as respostas agudas das CMLVs ao LPS podem contribuir para a fisiopatologia da sepse. Já o pré-condicionamento com LPS, promoveu aumentos, dependentes da IL-6, na migração e contração das CMLVs, com possível participação da SM22 α , o que evidencia que estas células mesmo após interrupção do estímulo apresentam modificações de fenótipo que podem contribuir para ocorrência de eventos cardiovasculares.

Palavras chave: 1. Células Musculares Lisas Vasculares 2. LPS 3. Migração Celular 4. Contração celular.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is defined as a potentially fatal organic dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. It presents an increasing incidence and number of survivors in the last two decades, and these survivors are at high risk of developing complications, such as cardiovascular events, and increased mortality in the years following sepsis. Lipopolysaccharide (LPS) activates Toll-like receptor 4 (TLR4), contributing to the inflammatory response in sepsis. TLR4 is also expressed in vascular smooth muscle cells (VSMCs), and can modulate the phenotypic profile of these, and, cooperate for the pathophysiology of sepsis and cardiovascular changes in post sepsis. **Objective:** To evaluate the effects of LPS stimulation on different CMLV phenotypes, in culture. **Methods:** Primary aortic VSMCs from Wistar rats were incubated with LPS (1 μ g/mL) in different experimental protocols. Two incubation conditions were used in cell contraction and migration assays: (1) acute stimulation: stimulus initiated in the assays; (2) Preconditioning: stimulation for 24 or 48 hours and withdrawal of the stimulus in the assays. Cell migration and contraction were evaluated using the wound-healing and collagen gel contraction methods, respectively. Nitric oxide production by the Griess reaction, cytokine, vimentin, collagen and SM-22 α gene expression by RT-PCR, and IL-6 production by ELISA were also evaluated. **Results:** Incubation with LPS for 6 hours increased the expression of cytokines (IL-1 β : 794%, IL-6: 2310%, TNF α : 380%, MCP-1: 99%), and for 24 hours increased the gene expression of secretory phenotype markers (collagen: 27%, vimentin: 29%) and SM22 α (53%), a molecule related to migration and cell contraction. LPS increased IL-6 secretion after 24 hours (487%) and 48 hours (418%), and NO secretion after 8 hours (8%) and 24 hours (52%), these increases in NO production reversed by aminoguanidine (iNOS inhibitor). Acute stimulation with LPS reduced migration (-20%) and contraction (-38%), reversed by aminoguanidine. Pre-conditioning with LPS increased the migration (16%) and the contraction (154%) of the VSMCs, which were reversed with tocilizumab (IL-6 receptor inhibitor). **Conclusion:** LPS exerts effects modulating the secretory, contractile and migratory phenotypes. Acute stimulation with LPS promoted nitric oxide-dependent reduction of migratory and contractile response, suggesting that the acute responses of VSMCs to LPS may contribute to the pathophysiology of sepsis.

On the other hand, pre-conditioning with LPS promoted IL-6-dependent increases in the migration and contraction of VSMCs, with a possible participation of SM22 α , evidencing that these cells even after discontinuation of the stimulus present phenotype modifications that may contribute to the occurrence of cardiovascular events.

Key words: 1. Vascular Smooth Muscle Cells 2. LPS 3. Cell Migration 4. Cell contraction.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE

A sepse é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. Na sepse ocorre a ativação precoce de mecanismos pró e anti-inflamatórios, sendo prejudicial a tecidos e órgãos, e, modificando o funcionamento de diferentes sistemas do hospedeiro: cardiovascular, neuronal, hormonal, autonômico, bioenergético e metabólico (Singer et al, 2016).

O quadro mais grave da sepse, choque séptico, é caracterizado por agravamento da disfunção orgânica com elevado prejuízo na perfusão de tecidos e disfunção hemodinâmica, associado com a dependência de vasopressor para manter a pressão arterial média acima de 65mmHg e lactato > 2mmol/L, após reposição volêmica adequada (Shankar–Hari et al, 2016).

A incidência estimada da sepse em países desenvolvidos é de 436 casos por 100.000 por pessoas/ano, com base no período de 1979 a 2015, no entanto ao considerar somente o período de 2003 a 2015 a incidência é de 707 casos por 100.000 pessoas/ano, o que evidencia um aumento na incidência estimada nos últimos anos (Fleischmann et al, 2016). Em concordância a isto, o aumento no número de hospitalizações por sepse/ano foi observado em países como Austrália e Nova Zelândia (Kaukoken et al, 2014), Taiwan (Shen et al, 2010) e Estados Unidos (Lagu et al, 2012). O Brasil apresentou aumento na incidência estimada anual de sepse de 31,5 para 47,4/100.000 pessoas, considerando os diagnósticos de hospitais vinculados ao Departamento de Informática do Sistema Único do Saúde Brasileiro (Neira et al, 2018).

Devido à gravidade e complexidade da síndrome séptica o custo para o tratamento pode atingir valores elevados do ponto de vista econômico. Nos países desenvolvidos, os gastos com a sepse representam de 20 a 40% das despesas com unidades de terapia intensiva, sendo o gasto estimado para cada paciente de 26 a 38 mil dólares (Moerer et al, 2002; Brun-Buisson et al, 2003; Lee et al, 2004). O

Brasil, um país em desenvolvimento, tem gasto médio de cerca de 10 mil dólares por paciente séptico (Sogayar et al, 2008).

Considerando Estados Unidos, Alemanha, Austrália, Taiwan, Noruega, Espanha e Suécia, que são países desenvolvidos, as taxas de letalidade da sepse e da sepse severa em ambiente hospitalar, são de 17% e 26% respectivamente, considerando o período de 2003 a 2015 (Fleischmann et al, 2016). Mas, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento como o Brasil a letalidade da sepse ainda é alta, em torno de 46,3%, e, quando considerados somente os casos que necessitaram de internação em unidades de terapia intensiva a letalidade é de 64,5%, com base no período de 2006 a 2015 (Neira et al, 2018). Além de ser alta, a mortalidade da sepse no Brasil é crescente, tornando a sepse um problema de saúde de grande importância (Taniguchi et al, 2014; Machado et al, 2017).

Apesar da gravidade, a letalidade da sepse, em países desenvolvidos, vem diminuindo ao longo dos anos, de forma progressiva. Dentre as razões que podem contribuir para este processo de redução estão às melhorias no processo de cuidado dos pacientes sépticos, devido aos avanços nos critérios diagnósticos e na abordagem terapêutica. (Kaukonen et al, 2014; Stevenson et al, 2014; Iwashyna and Angus, 2014).

Com a redução da letalidade, o número de sobreviventes a esta doença é crescente (figura 1), e, estes sobreviventes podem apresentar sequelas devido à sepse. Em curto prazo, os sobreviventes a sepse são readmitidos em maior frequência em até 90 dias pós-alta hospitalar, devido à ocorrência de infecções, insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória aguda e pneumonia por aspiração (Prescott et al, 2015). Em 180 dias da alta hospitalar estes sobreviventes já apresentam maior mortalidade (Goodwin et al, 2015), e no ano seguinte a alta utilizam mais os serviços de saúde, em relação aos não cometidos pela sepse (Prescott et al, 2014).

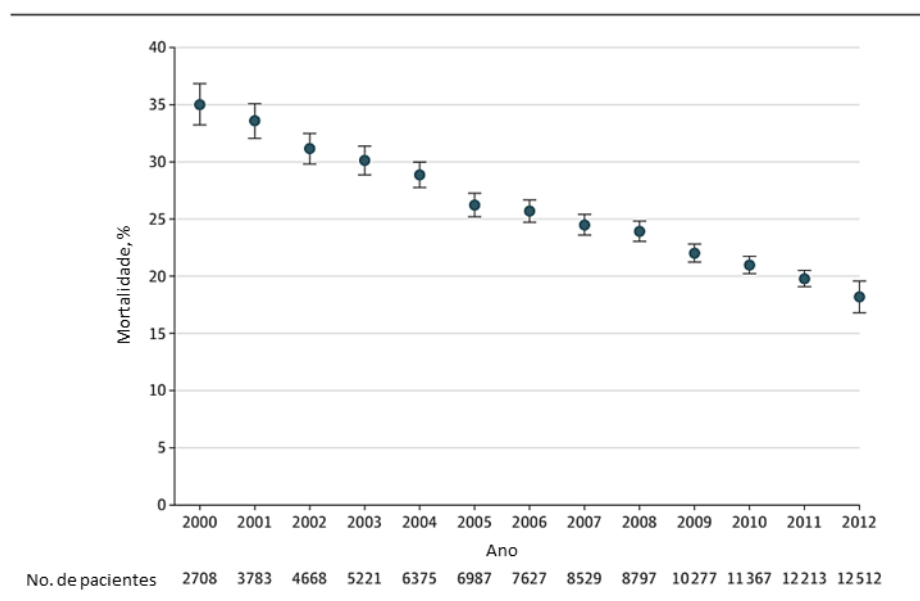


Figura 1: Mortalidade média anual e número de pacientes com sepse de 2000 a 2012 na Austrália e Nova Zelândia. As barras de erro representam intervalo de confiança de 95%. Adaptado de Kaukonen et al (2014).

A mortalidade aumentada em longo prazo em consequência ao um evento séptico, já é descrito por Quartin et al. (1997), que evidenciou que sobreviventes ao evento séptico continuavam com maior probabilidade de vir a óbito nos anos subsequentes ao evento (figura 2) (Quartin et al, 1997). A este respeito, Prescott et al (2016) mostraram que sobreviventes a sepse tem a mortalidade 22,1% maior que indivíduos nunca hospitalizados, 10,4% maior que indivíduos que já foram hospitalizados por infecção sem sepse e 16,2% maior que indivíduos já hospitalizados por condições inflamatórias sem infecção. Linder et al (2014) evidenciaram que sobreviventes a sepse, previamente saudáveis, tem maior mortalidade em até 10 anos após a sepse, sendo esta mortalidade 30,5% maior que a da população geral.

Além disto, os sobreviventes a sepse podem apresentar comprometimento cognitivo e disfunções funcionais, que em menor ou maior grau, os impossibilitam de exercer atividades diárias, mesmo 8 anos após a sepse (Iwashyna et al, 2010). Em adição, os sobreviventes têm risco aumentado de desenvolver demência, em relação a indivíduos que apresentaram infecções sem deflagrar a sepse, e, em relação a indivíduos que não passaram por infecções (Shah et al, 2013).

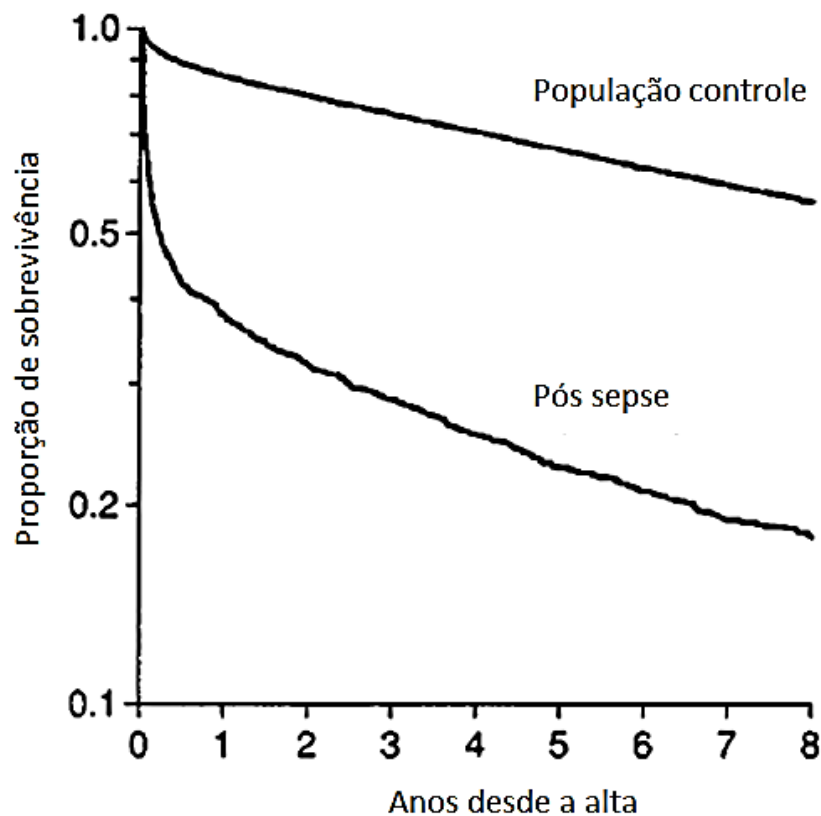


Figura 2: Curvas de sobrevivência de pacientes que tiveram alta pós sepse e de pacientes que tiveram alta após outras patologias (população controle). A proporção de sobrevivência foi plotada em escala logarítmica, logo o aumento na inclinação da curva traduz maior risco de morte. Em até 5 anos após sepse os sobreviventes têm maior probabilidade de vir a óbito em relação a população controle. Adaptado de Quartín et al (1997).

1.2 SEPSE E EVENTOS CARDIOVASCULARES

Além das possíveis complicações citadas, os sobreviventes a sepse apresentam também maior risco de complicações cardiovasculares. Em 29,5% dos pacientes sobreviventes ocorrem eventos cardiovasculares (infarto do miocárdio, ataque isquêmico transitório ou necessidade de revascularização de artéria coronária), no primeiro ano após sepse. O que representa um risco 13 vezes maior de desenvolver eventos cardiovasculares em relação à população em geral, e, 1,9 vezes maior em relação a indivíduos em condições de saúde semelhantes, exceto pela sepse (Yende et al, 2014).

Outros estudos também correlacionaram a ocorrência de eventos cardiovasculares em sobreviventes a sepse. Foi observado que ter tido sepse é um fator que aumenta o risco de ocorrência de acidente vascular encefálico após alta,

mesmo após um ano do evento séptico (Boehme et al, 2017). Além disto, o risco de doença cardíaca coronariana aguda em sobreviventes, em até 4 anos após sepse, é maior do que indivíduos que não tiveram sepse e apresentam condições sociais e de saúde semelhantes (Wang et al, 2017).

Outros estudos como o de Ou et al, (2016) constataram que sobreviventes a sepse, mesmo após 5 anos, apresentavam maior risco de desenvolver acidente vascular encefálico, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, morte súbita cardíaca ou arritmia ventricular, quando comparado a indivíduos que não tiveram sepse e que já foram hospitalizados ou não. Jafarzadeh et al, (2016) observaram que o risco de acontecimentos de eventos cardiovasculares pós-alta é diretamente proporcional à severidade do evento séptico, ou seja, maior após choque séptico.

Desta forma estes pacientes merecem atenção redobrada no acompanhamento após alta, e, a busca do entendimento da fisiopatologia da sepse, objetivando a compreensão destes desfechos em longo prazo, são de extrema importância.

1.3 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A sepse é uma síndrome heterogênea de início fundamentalmente pró-inflamatório causada pela resposta desbalanceada do sistema imune inato do hospedeiro frente a uma infecção, resultando em disfunção de órgãos (Hotchkiss et al, 2016) (figura 3).

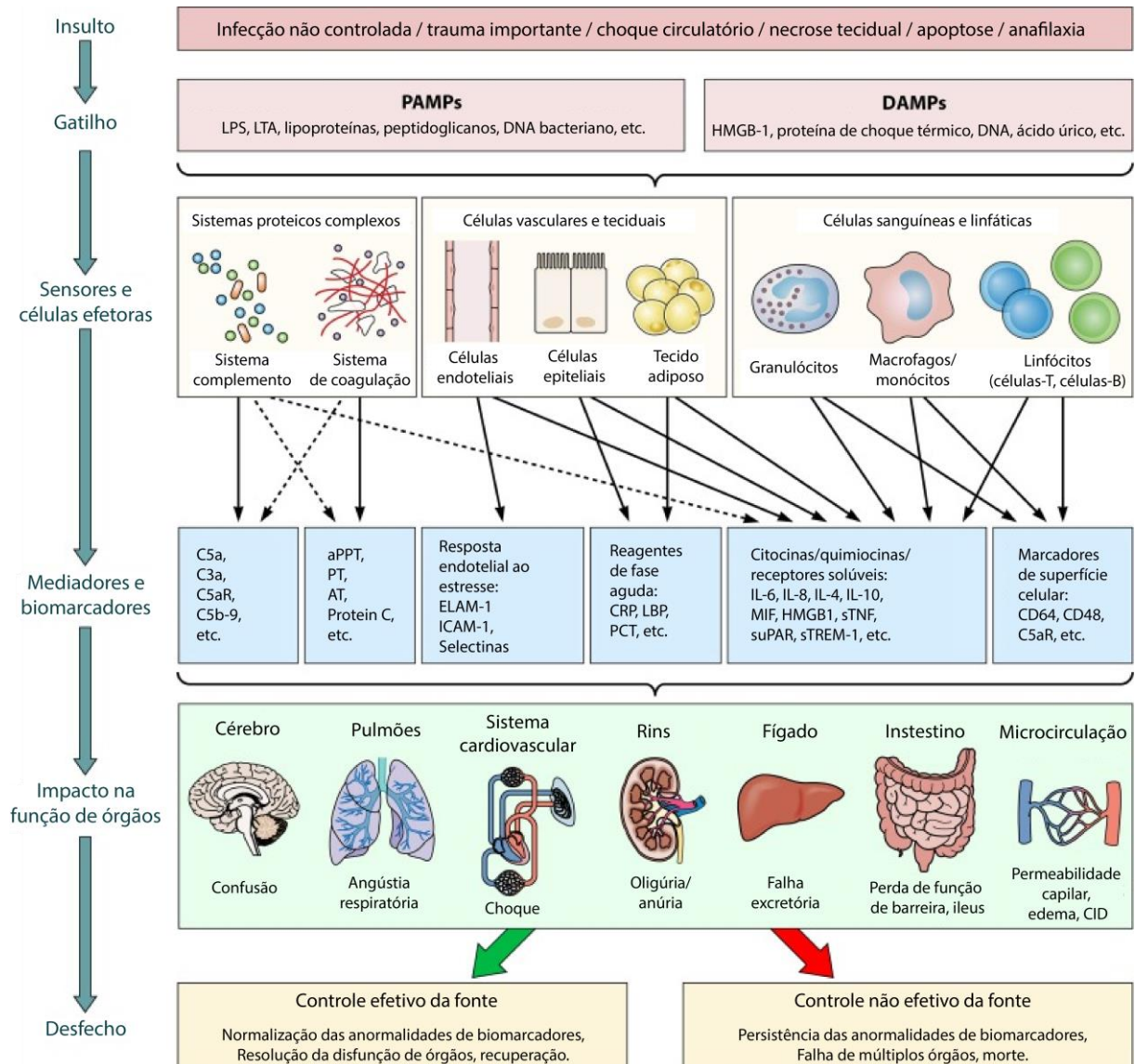


Figura 3: Visão geral da resposta inflamatória da sepse. Um insulto, como uma infecção não controlada, desencadeia a liberação de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e/ou DAMPs (padrões moleculares associados a danos), que são detectados por mecanismos de reconhecimento de padrões, como receptores de imunidade inata reconhecedores de padrões (PRRs) presentes na superfície, citosol ou núcleo das células de diferentes tecidos, que modulam a função do sistema imune através da ação de diferentes mediadores inflamatórios e biomarcadores. Como resultado, o insulto inicial pode ser resolvido ou não, e a função de diferentes órgãos pode ser temporariamente ou permanentemente prejudicada. LPS: lipopolissacarídeo; LTA: ácido lipotecóico; HMGB1: proteína B1 do grupo de alta mobilidade; C5a e C3a: componentes do sistema complemento C5a e C3a; C5aR: receptor do C5a; C5b-9: complexo de complemento terminal; aPPT: tempo de tromboplastina parcial ativada; PT: tempo de protrombina; AT: antitrombina; ELAM-1: molécula de adesão leucocitária endotelial 1; ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1; CRP: proteína C reativa; LBP: proteína de ligação ao LPS; PCT: procalcitonina; IL-6: interleucina 6; MIF: fator inibitório de migração de macrófagos; sTNF: fator de necrose tumoral solúvel; suPAR: receptor solúvel ativador de plasminogênio tipo uroquinase; sTREM-1: receptor deflagrador solúvel expresso em células

mieloides; mHLA-DR: antígeno leucocitário humano monocítico DR; CD64 e CD48: grupamentos de diferenciação 64 e 48; DIC: coagulação intravascular disseminada. Adaptado de Reihart et al (2012).

Inicialmente agentes infecciosos ativam o sistema imune inato através da ação dos receptores de imunidade inata reconhecedores de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (figuras 3 e 4). Os PAMPs estão em componentes estruturais dos agentes infecciosos, já os DAMPs em moléculas liberadas por células do hospedeiro danificadas em resposta aos agentes infecciosos (Tang et al, 2012).

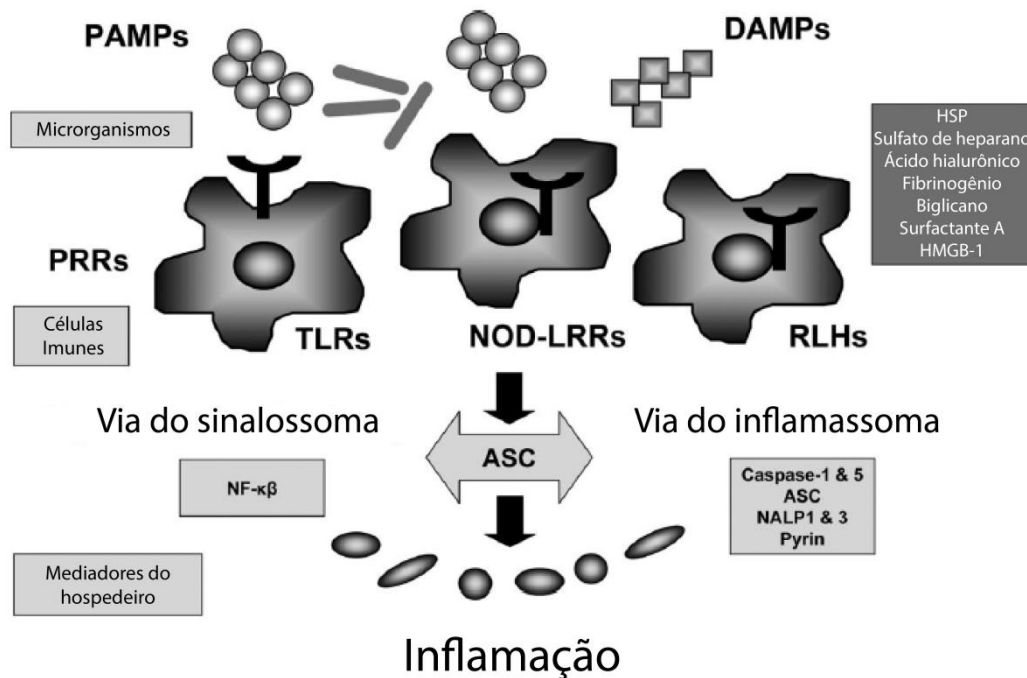


Figura 4: Representação dos PAMPs DAMPs e PRRs. Os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e os padrões moleculares associados a dano (DAMPs) ativam os receptores reconhecedores de padrões (PRRs) das células imunes. Composto os PRRs estão os receptores do tipo *Toll* (TLRs), domínios de oligomerização de nucleotídeos ricos em repetição de leucina (NOD-LRRs) e as helicases do tipo RIG-I (RLHs). A ativação dos PRRs resulta na liberação de mediadores derivados do hospedeiro que compõem a inflamação. Adaptado de Cinel e Opal, 2009.

Em consequência a ativação dos PRRs de células do sistema imune e de outros tipos de células, ocorre elevada produção de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO), citocinas, pró-inflamatórias como: fator de necrose tumoral alfa (TNF α), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), interleucinas 1 beta (IL-1 β) e 6 (IL-6), e anti-inflamatórias como a IL-10 (Schulte et al, 2013) (figura 3). O TNF α é

uma proteína que tem variadas funções, como conferir a um organismo resistência frente a infecções, e, a elevação em sua concentração sérica é correlacionada com complicações patológicas (Idriss e Naismith, 2000). A MCP-1 tem por função regular a migração e a infiltração de monócitos/macrófagos entre as células endoteliais (Deshmane et al, 2009). A IL-1 é uma citocina altamente inflamatória e atua aumentando a ativação do sistema imune do hospedeiro, no entanto o seu excesso é prejudicial as funções deste sistema (Dinarello, 1997). A IL-6 tem ações que afetam vários processos, incluindo no desenvolvimento de doenças vasculares. Dentre as ações da IL-6 está o aumento de expressão de proteínas de adesão por células endoteliais, aumento de permeabilidade vascular, aumento na liberação de quimiocinas e citocinas pelas células vasculares, o que leva a maior recrutamento de células imunes aos locais de infecção e conduz a processos como diferenciação de células imunes. (Hunter e Jones, 2015). A IL-10 tem importante ação anti-inflamatória e de modulação do sistema imune, no entanto seu excesso pode desencadear anormalidades e contribuir com o desenvolvimento de doenças imunológicas (Saxena et al, 2015).

Dentre os PRRs, está o TLR4, um componente da imunidade inata que tem como ligante principal o lipopolissacarídeo (LPS). Este receptor é expresso não somente em células do sistema imune, mas também em outros tipos de células como as musculares lisas vasculares (CMLVs) (Yang et al, 2006; Takeuchi e Akira, 2010; Lee et al, 2012). Na sepse o TLR4 tem papel importante na resposta inflamatória desregulada do organismo frente à infecção (Kuzmich et al, 2017). Em adição a isto, o nível de concentração deste receptor encontrado em amostras de sangue periférico humano é diretamente proporcional a severidade da sepse (Zhang et al, 2016).

O LPS (Figura 5), um PAMP, é um dos principais componentes da membrana externa da maioria das bactérias gram-negativas (Park and Lee, 2013), que são responsáveis por 62% das infecções de pacientes em unidades de terapia intensiva (Vicent et al, 2009). O LPS tem sido utilizado em estudos experimentais e considerado em estudos clínicos sobre a sepse, devido a associação que apresenta com a gênese de doenças inflamatórias, como a sepse (Kang et al, 2018; Thomas et al, 2014; Nijland et al, 2014; Ramachandran, 2014). Em estudos *in vitro*,

relacionados à sepse, o LPS tem sido amplamente utilizado em diferentes protocolos e apresenta diferentes ações, como estímulo a produção de citocinas pró-inflamatórias, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, e NO, via iNOS, por macrófagos (Marton et al, 2014; Yang et al, 2014; Yao et al, 2014), aumento na produção de NO, aumento da expressão da NADPH oxidase, consequente aumento na produção de radicais livres, e disfunção mitocondrial, por/em células epiteliais de túbulo renal (Quoilin et al, 2014), proliferação de células musculares lisas vasculares pulmonares (Jiang et al, 2016), ativação de plaquetas (Berthet et al, 2012), e produção de IL-6 e $\text{TNF}\alpha$, via NF- $\text{K}\beta$, por cardiomiócitos e macrófagos (Gao et al, 2015)

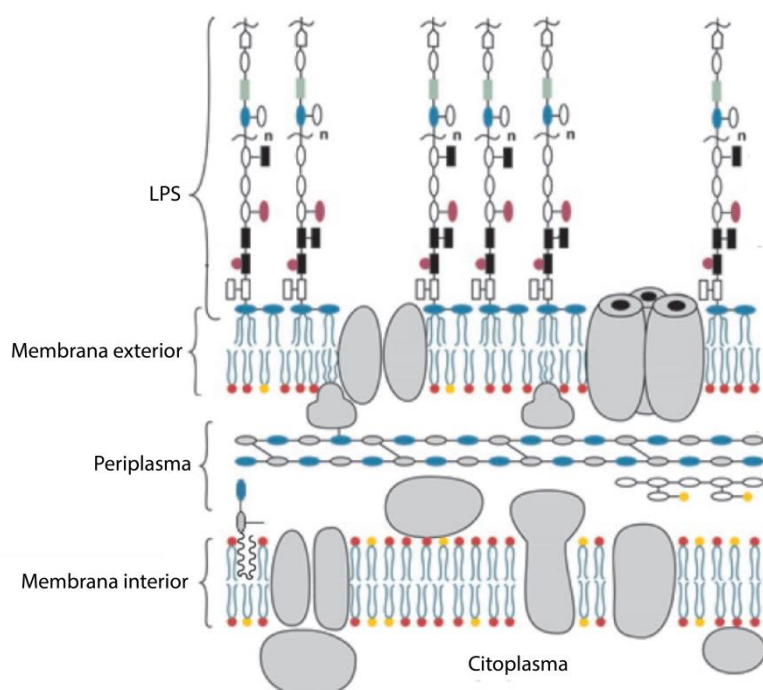


Figura 5: Representação do LPS e sua localização na membrana externa na *E. coli*. O LPS é essencial para o crescimento das bactérias gram-negativas que o possuem, e atua auxiliando na resistência destas bactérias a antibióticos, sistema complemento e outros estressores. Adaptado de Raetz e Whitfield, 2002.

Na fisiopatologia da sepse, as citocinas inflamatórias participam da ativação do endotélio vascular, que passa a expressar maior quantidade de moléculas de adesão, e promovem aumento da permeabilidade vascular devido a vasodilatação causada por meio da liberação de óxido nítrico, pelas células endoteliais. Estas ações das citocinas tem a finalidade de facilitar a entrada de outras células inflamatórias e de linfócitos da resposta adaptativa, para o local da infecção (Henkin

et. Al, 2009). Entretanto a ativação do endotélio na sepse é exacerbada, e a vasodilatação sistêmica, via óxido nítrico leva ao aumento excessivo da permeabilidade vascular e a consequente formação de edema, o que resulta em queda importante da pressão arterial (Fernandes e Assreuy, 2008; Galley, 2011; Tressel et al, 2011).

A sepse resulta em um padrão de resposta sistêmica imunológica à infecção, com alterações na atividade dos diversos mediadores da inflamação, da coagulação, do sistema complemento e metabolismo celular (Calvano et. Al, 2005). A liberação sistêmica de citocinas inflamatórias provoca vasodilatação, que leva à queda importante da pressão sanguínea juntamente com aumento da permeabilidade vascular, e consequentemente, redução do volume sanguíneo levando ao choque séptico e insuficiência de múltiplos órgãos. Neste, a liberação massiva de TNF-alfa ativa a coagulação intravascular disseminada com formação de trombos na microcirculação, que leva a falha na perfusão sanguínea culminando em oferta inadequada de oxigênio e nutrientes aos tecidos, o que desencadeia a disfunção destes e comprometimento da função dos sistemas ao qual fazem parte (Merle et al, 2015; Levi e Poll, 2017). A resposta inflamatória sistêmica, ainda pode provocar disfunção endotelial, juntamente com morte celular e dano mitocondrial causado por estresse oxidativo e hipoxemia citopática (Goldenberg et. al, 2011; Galley, 2011)

1.3.1 Alterações vasculares na sepse

Além das alterações sistêmicas, a sepse também conduz a alterações na função vascular em específico, causando vasoplegia, que é composta por disfunção vascular e hiporesponsividade dos vasos a vasoconstritores. Sua gênese está correlacionada com a ação de mediadores inflamatórios, como citocinas e NO, atuando não somente sobre as células endoteliais, mas também sobre as CMLVs (Burgdorff e Schumann, 2018).

A hiporesponsividade vascular foi observada também após sepse experimental (ligação e perfuração de cólon). Nishiike et al (2013) observaram que anéis de aorta de ratos submetidos a sepse apresentavam menores respostas

vasodilatadora, a acetilcolina, e vasoconstritora, a fenilefrina. Além disto, estes autores observaram que na sepse ocorre ativação do TLR4 por ligante endógeno, o HMGB-1, e quando este ligante tem sua ação inibida o comprometimento do relaxamento e contratilidade vasculares é prevenido, evidenciando que a sepse tem ação direta nas células vasculares, via ativação do TLR4 destas, e, não somente via a ativação deste receptor em células do sistema imune.

O comprometimento da contratilidade vascular ocorre também devido a alterações nas CMLVs em específico. Wurster et al (1994), constataram que anéis de aorta de ratos que foram submetidos a modelo experimental de sepse polimicrobiana (ligação e perfuração de cólon), apresentaram reduzida contração vascular em resposta ao cloreto de potássio e a noradrenalina, evidenciando uma alteração na capacidade de resposta contrátil de CMLVs de forma independente ao endotélio.

A ativação do TLR4 em CMLVs é correlacionada com alterações no citoesqueleto, através da redução da expressão de SM22 α e calponina, proteínas que contribuem para formação de fibras contráteis e na função contrátil destas células (Wang et al, 2017). Estes achados corroboram com as observações feitas por Price et al, (1999), em que após sepse experimental, por inoculação de bactérias gram-negativas, ou seja, que tem o LPS em sua membrana, houve o comprometimento da contratilidade de anéis de aorta, possivelmente através de alterações no aparato contrátil das CMLVs.

Além destes achados sobre os efeitos diretos da sepse sobre disfunção vascular durante o evento agudo, o grupo de De Souza et al (2016), demonstrou que aortas de ratos apresentavam disfunção endotelial, com redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, e aumento da resposta vascular contrátil a angiotensina II, em 60 dias após a sepse experimental polimicrobiana (ligação e perfuração de cólon). Sugerindo que mesmo após o evento agudo que a sepse representa, alterações em decorrência desta doença podem permanecer em longo prazo na vasculatura.

1.4. TLR4 E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Além da sepse, o TLR4 tem participação em outras doenças que tem a inflamação em seu desenvolvimento, como as cardiovasculares. Dentre estas doenças está a aterosclerose, que é caracterizada como uma inflamação crônica local na parede vascular. Na placa aterosclerótica a ativação do TLR4 por moléculas de LDL oxidada (tipo de LDL fundamental na fisiopatologia da aterosclerose), é um dos mecanismos que desencadeiam a expressão de citocinas inflamatórias por CMLVs, contribuindo com a inflamação crônica (Roshan et al, 2016).

A ativação do TLR4 em outras células presentes na placa aterosclerótica, como células imunes infiltradas, contribui para a ruptura da placa aterosclerótica e formação de trombos e doenças decorrentes (Roshan et al, 2016; Wu et al, 2018). Em adição, existe evidência epidemiológica que infecções bacterianas podem contribuir com a aterosclerose via ação do LPS em TLR4 expressos nas células de placas de ateroma (Frantz et al, 2007).

Na hipertensão arterial sistêmica a ativação anormal e prolongada do TLR4 por PAMPs ou DAMPs contribui para a manutenção da inflamação crônica de baixo grau, que é danosa aos tecidos do sistema cardiovascular, por contribuir com remodelamento vascular e cardíaco, doença renal e desregulação da ação do sistema nervoso central. Alterações estas que colaboram para a manutenção da hipertensão arterial sistêmica (De Batista et al, 2014; Nunes et al, 2018). Desta forma, os processos inflamatórios vêm sendo descritos como componentes dentro da fisiopatologia também das doenças cardiovasculares. Como a sepse apresenta um quadro inflamatório exacerbado talvez este fato possa auxiliar no entendimento do achados de aumento de eventos cardiovasculares nos pacientes sépticos mesmo anos do diagnóstico da sepse.

1.5 CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

As CMLVs compõem a túnica média dos vasos sanguíneos, são células especializadas, que tem por função principal contrair (Figura 6), regulando assim o tônus vascular, a pressão sanguínea e o fluxo sanguíneo. Para isto, CMLVs

quiescentes apresentam um fenótipo contrátil caracterizado por reduzidas taxas de proliferação e migração, baixa atividade secretória de mediadores inflamatórios, e com expressão de proteínas específicas a este fenótipo, como: proteína de músculo liso 22 α (SM22 α), α -actina de músculo liso e calponina (Tennat e McGeachie, 1990; Owens, 1995). Esta última proteína tem função de regular a contratilidade de células musculares lisas. A ligação do cálcio a calmodulina, junto à fosforilação da proteína quinase C, levam a dissociação da calponina do filamento de actina o que facilita a ação do sistema actomiosinico e em consequência, a contração celular (Liu and Jin, 2016).

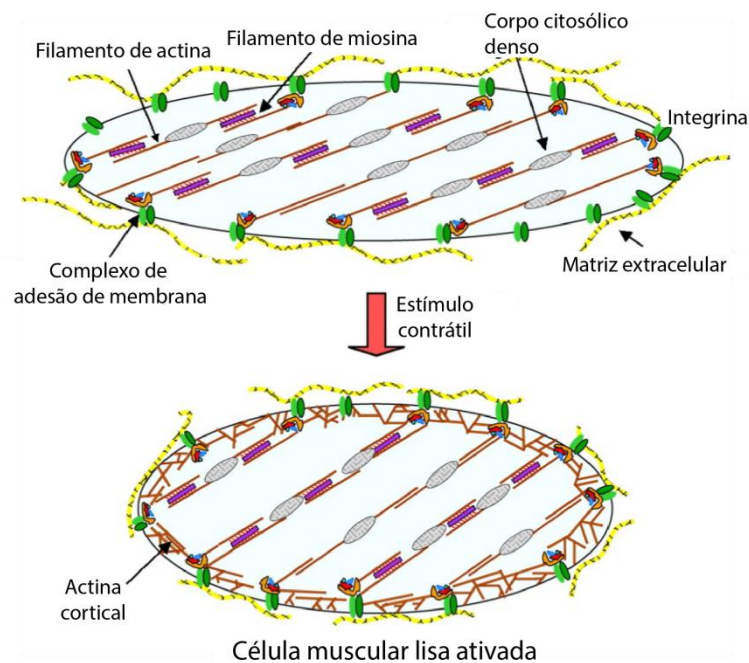


Figura 6: Modelo da dinâmica do citoesqueleto na contração de CMLVs. A contração das CMLVs é feita via estimulação de complexos proteicos nas junções entre membrana celular e matriz extracelular, que regulam a formação de uma rede subcortical de filamentos de actina e fortalecem as conexões entre os filamentos de actina e integrinas. A rede de filamentos de actina subcortical fortalece a membrana para transmissão de força gerada pelo sistema actomiosinico e permite a adaptação da célula do músculo liso a forças externas. Fonte: Adaptado de Gunst e Zhang, 2008.

As CMLVs podem alterar o fenótipo de maneira reversível, assumindo outras funções. Isto ocorre através de um processo em que a célula reduz a expressão de proteínas do fenótipo contrátil, ao mesmo tempo em que passa a expressar outras proteínas como a vimentina e apresentar características como: aumento na proliferação e/ou migração, redução de capacidade contrátil e maior atividade secretória de colágeno, citocinas e enzimas. Estas características compõem o

fenótipo denominado de secretório e o processo de troca de fenótipo também é chamado de dediferenciação (Zhang et al, 2015).

A dediferenciação das CMLVs ocorre em resposta a agressões vasculares, e, inicialmente atua como mecanismo que visa o reparo vascular, para manutenção das funções vasculares (Owens et al, 2004). Entretanto, em condições patológicas pró-inflamatórias, em que o estímulo à mudança de fenótipo se torna constante devido à ação de mediadores inflamatórios, o processo de dediferenciação se torna deletério, com consequente manutenção da migração, proliferação e atividade secretória aumentadas, que, são componentes do remodelamento vascular em longo prazo patológico. (Rzucidlo et al, 2007; Schulte et al, 2013).

Dentre os fenótipos modulados nos processos patológicos, está a migração das CMLVs. Que consiste um processo complexo que envolve diferentes estruturas celulares, como proteínas de citoesqueleto, de maneira coordenada para que ocorra o mecanismo de migração (Figura 7) (Fuller e Benos, 2008). Quando a migração é iniciada em condições patológicas, as CMLVs migram da túnica média para a íntima, o que contribui com o espessamento da camada íntima, perda de diâmetro do lúmen vascular e desenvolvimento de doenças vasculares (Goldman et al, 2007).

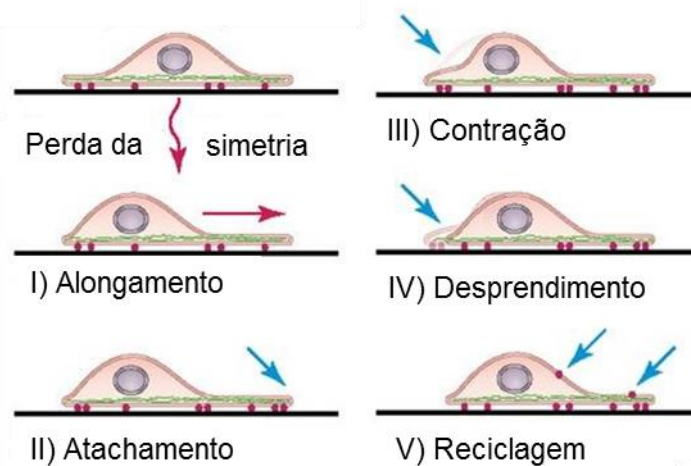


Figura 7: Mecanismo de migração celular. A perda de simetria celular leva a polarização celular e a migração direcionada. I a V: etapas necessárias a migração celular. I) Protusões ricas em actina se alongam da borda de ataque da célula. II) Proteínas de adesão unem a protusão recém formada a matriz. III) Contração actomiosínica leva a retração da parte traseira da célula e sua progressão para frente. IV) Proteínas de adesão liberam-se da matriz e permitem a progressão do movimento. V) Reciclagem das estruturas contráteis para iniciar a etapa I. Adaptado de Vedula et al, 2013.

Mesmo sabendo que após os eventos agudos causados pela sepse, o risco de eventos cardiovasculares esteja aumentado, os mecanismos que contribuem para este risco não estão totalmente elucidados. O remodelamento vascular, que ocorre com ação das CMLVs dediferenciadas, pode ser um destes mecanismos que contribui para este risco elevado. Assim a avaliação fenotípica de CMLVs estimuladas por um ligante do TLR4, o LPS, pode trazer esclarecimentos a cerca de como ocorre a participação destas células no desenvolvimento de eventos cardiovasculares no pós-sepse, visto que o TLR4 além de participar no desenvolvimento da sepse, tem papel conhecido na fisiopatologia de doenças cardiovasculares.

Além disto, o LPS também tem sido utilizado para estimular CMLVs em diferentes estudos *in vitro*, buscando elucidar como esta estimulação sobre as CMLVs contribui com diferentes doenças inflamatórias, como a sepse (Cohen et al, 1998; Motterlini et al, 1998; Deetjen et al, 1999; Klein et al, 2000; Horewicz et al, 2015; Scheschowitsch et al, 2015). No entanto, estes estudos não avaliam como esta modulação fenotípica das CMLVs, pelo LPS, pode continuar mesmo após o término no estímulo. O que se assemelha ao que ocorre no pós sepse, em que após o evento agudo, as alterações causadas possivelmente colaboram com a ocorrência de eventos cardiovasculares.

2 JUSTIFICATIVA

A sepse é um problema de saúde pública que onera financeiramente os serviços de saúde não somente durante sua vigência, mas também após. Os pacientes sobreviventes a sepse apresentam maior risco de desenvolver problemas de saúde em longo prazo, como eventos cardiovasculares. Problemas estes que levam estes pacientes a usar os serviços de saúde com maior frequência que o restante da população, associados muitas vezes a perda de fase produtiva durante a vida adulta. Portanto, a busca da compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que possam auxiliar no entendimento do desenvolvimento destes agravos a saúde, no pós-sepse, pode subsidiar posteriormente desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas objetivando prevenir o acontecimento, ou mesmo minimizar a gravidade dos agravos.

As CMLVs podem participar no desenvolvimento de alterações que levem a eventos cardiovasculares, e, compor os mecanismos fisiopatológicos relacionados ao desenvolvimento de doenças no pós-sepse. Estas células sofrem alterações fenotípicas, ou seja, em suas funções, na ocorrência da sepse. Alterações estas que podem, mesmo após sepse, persistir e contribuir com processos patológicos cardiovasculares.

Assim, a avaliação fenotípica das CMLVs, submetidas ao LPS, que representa ao menos em parte, as condições impostas na sepse, se faz importante. E, para que o detalhamento necessário das modificações sofridas pelas CMLVs seja obtido, é imprescindível o uso de experimentação *in vitro*, por meio de cultura de células. Os ensaios em cultura de células permitem maior controle das condições pelas quais as CMLVs são submetidas e maior detalhamento de como estas células respondem a estas condições e dos mecanismos necessário para tais respostas, sem interferências que ocorreriam em estudos *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- I. Avaliar os efeitos da estimulação com LPS sobre diferentes fenótipos de CMLVs, provenientes de aorta de ratos, em cultura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar os efeitos da exposição ao LPS sobre a viabilidade das CMLVs;
- II. Avaliar os efeitos da estimulação com LPS sobre os fenótipos migratório e contrátil das CMLV;
- III. Avaliar a expressão gênica de marcadores dos perfis contrátil e secretório das CMLVs expostas ao LPS;
- IV. Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias e óxido nítrico (NO) das CMLVs após estimulação com LPS;
- V. Avaliar vias moleculares (IL-6 e NO) que possam estar participando das alterações fenotípicas observadas nas CMLVs após estimulação com LPS.

4 METODOLOGIA

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com 10 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração, em gaiolas apropriadas. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colegiado Brasileiro de Experimentação Animal, com aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo sob protocolo nº 67/2016 (Anexo I).

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

As CMLVs foram obtidas através da técnica de explante da aorta torácica. Após o animal ser anestesiado com administração intraperitoneal de quetamina 80 mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg, a artéria aorta foi retirada e colocada em placa de Petri contendo solução tampão fosfato-salina (STFS) + penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 U/ml, onde foi removido o tecido conjuntivo. Em seguida, a artéria foi armazenada em um tubo falcon contendo STFS + Penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 U/ml, e levada para o fluxo laminar.

A partir disto, os procedimentos foram realizados dentro de capela com fluxo laminar. A aorta foi aberta longitudinalmente e foi removida a camada de células endoteliais do vaso através de leve força mecânica realizada no lúmen vascular, com uma pinça cirúrgica. O tecido vascular foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 x 2 mm, que foram colocados com camada muscular orientada para o fundo de uma placa de cultura de 6 poços, previamente tratada com gelatina porcina, composta por proteínas derivadas da hidrólise do colágeno, a 3%.

Os fragmentos foram mantidos em meio de cultura DMEM *high glucose* suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 U/ml, em estufa umidificada, a 37°C e a 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas.

Após sete a dez dias, foi observada a presença de CMLVs, procedentes dos explantes, no fundo dos poços da placa. Ao atingirem 80% da confluência, as CMLVs foram soltas. Para isso, as células foram lavadas com STFS sem cálcio e sem magnésio, e expostas à tripsina-EDTA a 0,05 % por 3 min em incubadora a 37°C. A tripsina foi neutralizada com meio de cultura com 10% de SFB, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 U/ml, as células soltas foram semeadas em garrafas de 75 cm² e mantidas em incubadora umidificada a 37°C e a 5% de CO₂. Para manter o crescimento, as células foram continuamente repicadas ao atingirem 100% da confluência, e 30% destas foram devolvidas para a garrafa. Cada passagem durou entre 4 e 7 dias.

Células entre a segunda e a quarta passagem foram utilizadas nos protocolos experimentais, minimizando assim a perda de características pelas CMLVs, que ocorre com o avançar das passagens (Worth et al, 2001).

Nos protocolos experimentais, os inibidores foram adicionados ao meio de cultura após as células passarem pela privação de SFB (0,5%) e mantidos por 30 minutos sem que o estímulo com LPS (1 µg/mL) fosse iniciado. Foram utilizados, o inibidor da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), aminoguanidina (#A7009, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 1 mM, e, o inibidor do receptor de IL-6, tocilizumab (Roche, South San Francisco, CA, EUA) a 100µg/mL.

As concentrações de LPS, aminoguanidina e tocilizumab foram estabelecidas primeiramente com base nas concentrações destas substâncias utilizadas em experimentos em cultura de células de outros estudos (LPS: Mazighi et al, 2004; Scirocco et al, 2010; Thomson et al, 2015; Aminoguanidina: Kidachi et al, 2007; Tocilizumab: Wang et al, 2016). A partir disto foram conduzidos testes dose-resposta prévios, que resultaram no estabelecimento das concentrações utilizadas nos protocolos experimentais.

4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para confirmar que as células extraídas eram CMLVs, realizamos a marcação por imunofluorescência da proteína de citoesqueleto α - actina de músculo liso. Para

isto, 4×10^4 células/poço foram plaqueadas em placa de 24 poços e cultivadas até atingir 60% da confluência. As células foram lavadas 3x com STFS, fixadas com solução de paraformaldeído a 4% por 30 minutos em temperatura ambiente, e lavadas 3x com STFS. Em seguida, as células foram permeabilizadas com solução de Triton T-X100 0,15% por 15 minutos, lavadas 3x com STFS e foi realizado o bloqueio destas com albumina de soro bovino a 4% em STFS, por uma hora, para que não houvesse ligações inespecíficas. Em sequência, foi feita a incubação com anticorpo primário (Anti α -actina de músculo liso - #A5228, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, proporção de 1:10.000) por 12 horas em geladeira.

Após isto, as células foram lavadas 3x com STFS, e foi feita a incubação com anticorpo secundário Alexa flúor (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), (proporção de 1:500) durante 45 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, as células foram lavadas 3x com STFS, incubadas com o marcador nuclear intercalante de DNA (DAPI 20ug/mL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 20 minutos e lavadas 3x com STFS. A aquisição de imagens foi realizada em microscópio de fluorescência, aumento de 40x, foram registradas 3 imagens de diferentes locais de cada poço, com os seguintes comprimentos de onda: Alexa flúor: 488 nm e DAPI: 345nm, utilizando as técnicas de deconvolução e sobreposição de imagens.

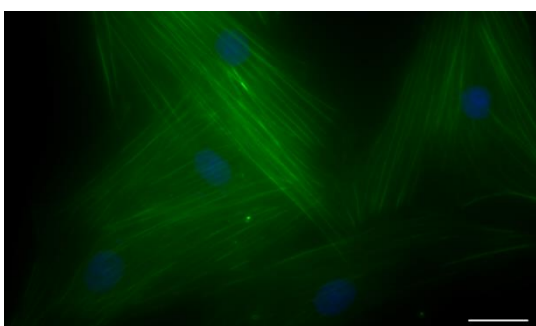


Figura 8: Imunofluorescência das CMLVs. Em verde marcações de α -actina e em azul marcações dos núcleos. Barra de escala: 5 μ m.

4.3 MIGRAÇÃO CELULAR

O protocolo de migração celular foi realizado pelo método de *Wound-Healing* (Liang et al, 2007), que consiste em realizar uma ferida/risco na camada celular e mensurar a área migrada a partir da comparação entre a área inicial e a área final.

Para isto, foram plaqueadas 55×10^4 células/poço em placa de 6 poços. Ao atingirem 100% da confluência, as células foram colocadas em privação de soro fetal bovino (0,5%) e estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) segundo os seguintes tipos de incubação:

- 1) Pré-condicionamento com LPS: após período de privação as células eram incubadas em meio a 0,5% de SFB com LPS, por 24 horas, sendo este meio removido no momento da realização da ferida/risco, e durante o ensaio foi mantido somente o meio a 0,5% de SFB;
- 2) Estímulo agudo com LPS: após período de privação, era realizado a fenda/risca e em seguida era adicionado meio a 05% de SFB com LPS, sendo este meio mantido durante todo o ensaio.

Os tipos de incubação estão representados na forma de fluxogramas no anexo II desta dissertação.

Para realização do ensaio o meio de cultura foi aspirado e foi feito uma ferida/risco na camada celular, com uma ponteira de 10 μL , retirando as células de uma extremidade à outra do fundo do poço (Figura 9). Em seguida, cada poço foi lavado 3x vezes com STFS, para retirada das células suspensas, e foi adicionado meio de cultura celular, conforme os tipos de incubação.

Foram feitas 3 imagens por poço, em cada tempo (0 hora e 8 horas), sempre nos mesmos pontos. As imagens foram analisadas utilizando o programa Imagem J. A área de migração, em pixels, foi obtida pela comparação entre o tamanho de cada ferida/risco nos tempos acima citados.

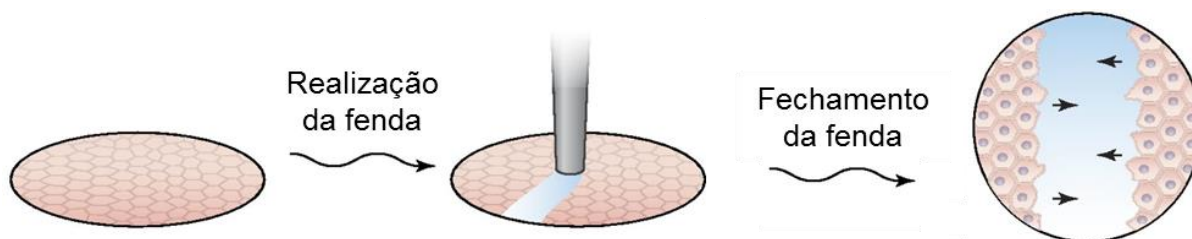


Figura 9: Ensaio de migração por Wound-Healing. A área da fenda imediatamente após sua realização corresponde a área inicial, e a área em determinado tempo do ensaio avalia o quanto as células migraram para a área da fenda, a fechando. Adaptado de Vedula et al, 2013.

4.4 CONTRAÇÃO CELULAR

A contratilidade das CMLVs foi medida utilizando o protocolo de contração em gel de colágeno (Ngo et al, 2006), que consiste em formar géis de colágeno com células em seu interior, imitando o meio no qual as células estão inseridas originalmente, de forma que possam ser observadas indiretamente as variações no tamanho das células, por meio da observação das mudanças de medidas apresentadas pelos géis em que estão inseridas. Para isto, foram plaqueadas 55×10^4 células/poço em placa de 6 poços, e cultivadas até 100% da confluência e submetidas a privação de SFB (0,5%) por 24 horas. Em seguida as células foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e utilizadas no ensaio de contração, segundo os seguintes tipos de incubação:

- 1) Pré-condicionamento com LPS: após período de privação as células eram incubadas em meio a 0,5% de SFB com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48 horas. Após isto o meio com estímulo era descartado, as células soltas e usadas para fazer os géis. Durante o ensaio os géis de colágeno contendo as células foram mantidas em meio a 0,5% de SFB sem LPS.
- 2) Estímulo agudo com LPS: após período de privação, as células eram soltas e usadas para fazer os géis. Nos poços em que os géis estavam foi adicionado meio a 0,5% de SFB com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Este meio foi mantido durante o ensaio.

Os tipos de incubação estão representados na forma de fluxogramas no anexo II desta dissertação.

O ensaio foi realizado utilizando o *Collagen I High Concentration Rat Tail* (Corning, Two Oak Park, Bedford, MA, USA), conforme orientações do fabricante. As células foram lavadas com STFS sem cálcio e sem magnésio, e expostas à tripsina-EDTA a 0,05% por 3 min em incubadora a 37°C, para soltar as células. A tripsina foi neutralizada com meio de cultura com 10% de SFB.

As células suspensas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado, e as células ressuspensas em solução de colágeno (2,5 mg de colágeno/mL), chegando a concentração de 4×10^5 células/mL. Em seguida, 500µL desta solução de colágeno com células foram adicionados por poço em placas de 12 poços, que foram incubadas em estufa a 37°C por uma hora para polimerização do colágeno, formando um gel em cada poço. Em seguida, os géis foram soltos das paredes dos poços mecanicamente e foi adicionado meio de cultura com 0,5% de SFB nos poços, conforme incubação. Foram feitas fotos de cada gel em diferentes tempos (0 hora e 24 horas), as imagens foram analisadas com o *software* Image J e a contração foi obtida pela comparação do tamanho de cada um dos géis, em mm², nos tempos acima citados.

4.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico foi mensurada indiretamente pela quantificação de nitrito via reação de Griess (1879), que avalia a concentração deste subproduto do óxido nítrico (NO) em uma solução, através de ensaio colorimétrico.

Foram plaqueadas 55×10^4 células/poço em placa de 6 poços. Após as CMLVs atingirem 100% da confluência, foram submetidas à privação de SFB (0,5%) por 24 horas, seguida da estimulação com LPS (1 µg/mL), em DMEM *high glucose* sem vermelho de fenol, por 8 ou 24 horas, protegidas da luz. Após o estímulo o meio de cultura foi coletado e armazenado em -80°C protegido da luz. A incubação está representada na forma de fluxogramas no anexo II desta dissertação.

A dosagem de nitrito foi feita em local protegido da luz e para a realização do protocolo, 100 µL do meio coletado foram adicionados por poço, em uma placa com 96 poços. Em sequência, seguindo esta ordem, foram adicionados 50 µL de cloreto de N-(1-Naphthyl) etilenodiamida a 0,1% e 50 µL de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 2,5%, a cada poço da placa, que foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos.

Após isto, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 540nm, utilizando o equipamento Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Como padrão foi utilizado nitrito de sódio diluído em DMEM *high glucose* sem vermelho de fenol em diferentes concentrações (0µM, 1µM, 2µM, 5µM, 10µM, 15µM, 20µM, 30µM).

4.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE CAPTURA (ELISA)

Para mensurar a produção de IL-6 em meio de cultura, foi feito o ELISA utilizando o *Rat IL-6 ELISA kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguindo orientações do fabricante. Para isto, foram plaqueadas 55×10^4 células/poço em placa de 6 poços. Após as CMLVs atingirem 100% da confluência, foram submetidas à privação de SFB (0,5%) por 24 horas e foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) em meio a 0,5% de SFB, por 24 ou 48 horas. O meio de cultura foi coletado e armazenado a -80°C até o ELISA. A incubação está representada na forma de fluxogramas no anexo II desta dissertação.

O ensaio foi conduzido em temperatura ambiente, sendo 100µL do meio de cultura adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços, previamente sensibilizada. Após 2,5 horas a placa foi lavada com solução de lavagem e foi feita incubação com 100 µL do anticorpo biotilado anti-IL-6 por poço durante 1 hora. Em seguida a placa foi lavada e 100µL da solução de estreptavidina-HRP foram adicionados em cada poço e incubados por 45 minutos. Após lavagem, 100µL do substrato para peroxidase, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), foi adicionado em cada poço e mantido por 30 minutos. Finalmente 50µL da solução de parada foi adicionada por poço e foi feita a medida da absorbância em comprimento de onda

de 450 nm no equipamento Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

4.7 VIABILIDADE CELULAR

Foi utilizada a marcação com azul de tripan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para determinar o número de células em necrose vs. viáveis. O método baseia-se no princípio de que as células viáveis possuem membranas celulares intactas e não são permeáveis, enquanto que as células mortas não possuem membranas intactas e são permeáveis ao azul de tripan ficando marcadas em azul.

Para isto, foram plaqueadas 55×10^4 células/poço em placa de 6 poços. Após as CMLVs atingirem 100% da confluência, foram submetidas à privação de SFB (0,5%) por 24 horas, em sequência foram estimuladas por 48h com LPS (1µg/mL) em meio de cultura com 0,5% de SFB, soltas da placa com o uso de tripsina-EDTA a 0,05% por 3 min em incubadora a 37°C, e misturadas com o azul de tripan na proporção de 1 para 1 em volume. Então foi realizada a contagem das células viáveis e mortas em câmara de Neubauer. Com base nos valores obtidos foi calculado o percentual de células viáveis.

4.8 APOPTOSE E NECROSE CELULAR

A avaliação da apoptose e necrose foi realizada por marcação celular com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio e analisada por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA, USA). A anexina V-FITC se liga a fosfatidilserina, uma proteína que é externalizada na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico, e o iodeto de propídeo se liga ao DNA das células em necrose, uma vez que o iodeto só é capaz de penetrar em células que não possuem a membrana celular íntegra. Para tanto, foi utilizado o kit BD Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Diego, USA).

Resumidamente, 55×10^4 células/poço foram plaqueadas, em placas de 6 poços. Ao atingirem 100% da confluência, as células foram submetidas à privação de SFB (0,5%) por 24 horas e em seguida foram expostas ao LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 48 horas. Após a exposição, as células foram soltas da placa com o uso de tripsina-EDTA a 0,05% por 3 min em incubadora a 37°C , centrifugadas à 153g por 5 minutos e lavadas 2x com STFS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500 μL tampão de ensaio (*Binding Buffer* 1x), centrifugadas à 153 g durante 10 minutos e ressuspensas em 500 μL de tampão de ensaio, na concentração de 1×10^6 células/mL. Após isto, a 100 μL do tampão de ensaio com células, foram adicionados 2 μL de Anexina V-FITC e 2 μL de PI, que foram mantidos durante 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Foram adquiridos 10.000 eventos em citômetro de fluxo e os dados foram analisados no software Cell Quest.

4.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)

A técnica de reação de cadeia da polimerase em tempo real, foi utilizada para avaliar a expressão gênica do RNA mensageiro do TLR4, das citocinas MCP-1, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e IL6, e dos marcadores de fenótipo calponina, SM22 α , colágeno 1 e vimentina. Foram plaqueadas 55×10^4 células/poço em placa de 6 poços. Ao atingirem 100% da confluência as células foram submetidas à privação de soro fetal bovino (0,5%) por 24 horas. Após isto, as células foram expostas ao LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em meio de cultura com 0,5% SFB, por 2, 6 ou 24 horas para avaliar a expressão gênica de TLR4, citocinas e marcadores fenotípicos, respectivamente. As incubações estão representadas na forma de fluxogramas no anexo II desta dissertação.

A extração de RNA total das amostras foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo as orientações do fabricante. A expressão de ciclofilina A foi utilizado como normalizador. Na tabela 1 constam os *primers* utilizados.

| mRNA | Forward (5'-3') | Reverse (5'-3') |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|
| Calponin 1 | CGGCGTCACCTCTATGATCC | TCAAAGATCTGCCGCTTGGT |
| SM22 α | TTGTAATGCAGTGTGGCCCT | CAGGCTGTTACCAACTTGC |
| Collagen 1 | GTACATCAGCCCAAACCCCA | CAGGATCGGAACCTTCGCTT |
| Vimentin | AGGGGAGGAGAGCAGGATTT | GGAGTGGGTGTCAACCAGAG |
| TNF α | ATGGGCTCCCTCTCATCAGT | GCTTGGTGGTTTGCTACGAC |
| IL-6 | CCACCCACAACAGACCAGTA | ACAGTGCATCATCGCTGTTC |
| IL1- β | CAGCTATGGCAACTGTCCCT | AAGGGCTTGAAGCAATCCT |
| MCP-1 | TAGCATCCACGTGCTGTCTC | CAGCCGACTCATTGGGATCA |
| TLR4 | GATCTGAGCTTCAACCCCT | CATGCCATGCCTTGTCTTCAA |
| Cyclophilin A | TGGCAAGCATGTTGGGTCTTTGGGAG | GGTGATCTTCTTGCTGGTCTGCCATTC |

Tabela 1: *Primers* utilizados na RT-PCR

A concentração de RNA total foi quantificada usando o NanoDrop (NanoDrop Technologies, EUA). A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1%, marcado com Nancy-520 (Sigma-Aldrich, EUA). O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 20 minutos. As bandas foram observadas em um transluminador UV. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 2 μ g de RNA total. Para obtenção da primeira fita de cDNA, as amostras foram incubadas com 0,5 μ g/mL de oligo dT12-18 a 65°C por 5 min. A transcrição reversa das amostras foi realizada em volume total de 20 μ L contendo 3U de RNAsin (Promega, Madison, USA), 10 mM de dNTPs, 0.1 M de DTT, 1X tampão de enzima, e 2.5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após incubação por 1 hora a 42°C, a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras foram rapidamente colocadas em gelo para desnaturação de híbridos RNA-cDNA formados.

A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo sistema de detecção do produto específico amplificado no equipamento 7500 Real Time PCR System (Biosystem, CA, USA) realizada com o kit SYBRgreen PCR Master Mix (Biosystem, CA, USA). Inicialmente, foi realizada a curva de concentração para cada *primer*. Para o cálculo da expressão gênica, o método de ciclo “comparative threshold” (Ct) foi usado para análise dos dados. Ct indica o número do ciclo fracional que a quantidade do alvo amplificado atinge um limiar fixo, e o Δ Ct é a diferença no ciclo limite para o alvo (gene de estudo), tendo como referência a ciclofilina A. Os níveis

de expressão gênica foram obtidos pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct$ é o valor ΔCt subtraído do ΔCt da amostra) e expressos em percentual do controle.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados por média \pm erro padrão da média (EPM). Para estatística inferencial, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância (ANOVA) uma via e teste *t*. Quando identificadas diferenças significantes na análise de variância, foi aplicado o teste post-hoc de Bonferroni para localizar as diferenças. Todas as análises e construções gráficas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0.

5 RESULTADOS

Inicialmente avaliamos a existência do receptor de LPS, o TLR4, nas CMLVs extraídas em cultura primária e se a exposição ao LPS era capaz de modular a expressão deste receptor. Como observado na figura 10, a exposição com LPS por 2 horas foi suficiente para aumentar a expressão dos mRNA para o TLR4 em 40%.

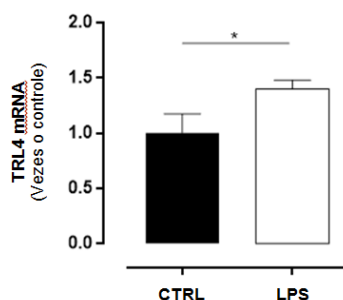


Figura 10: Efeito do LPS na expressão gênica de TLR4 das CMLVs. CTRL: células controle; LPS: CMLVs submetidas a 2 horas de exposição ao LPS (1µg/mL). *p < 0,05, teste t, n=6. Dados representados por média ± EPM.

5.1 VIABILIDADE CELULAR

Inicialmente, avaliamos se a concentração de LPS (1µg/mL) utilizada nos protocolos experimentais seria capaz de afetar a viabilidade celular, modificando o percentual de células em necrose ou apoptose. Como representado na figura 11, mesmo após 48 horas de estímulo, o LPS não afetou a viabilidade das CMLVs, quando esta foi avaliada pelo ensaio com azul de tripan, que quantifica o número de células mortas.

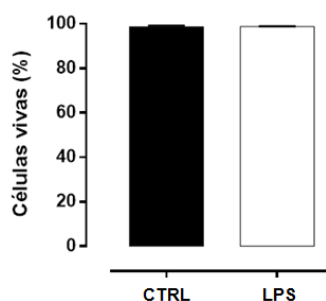


Figura 11: Mortalidade das CMLVs pelo azul de tripan. CTRL: células controle; LPS: células submetidas a 48 horas de exposição ao LPS (1 µg/mL). Teste t, n=5. Dados representados por média ± EPM.

O passo seguinte foi avaliar a viabilidade celular de forma mais precisa, através da quantificação de células em apoptose, via Anexina V conjugada com FITC, e em necrose, via iodeto de propídio, por citometria de fluxo (figura 12). Novamente não observamos diferentes percentuais de necrose ou apoptose nas CMLVs estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 48 horas.

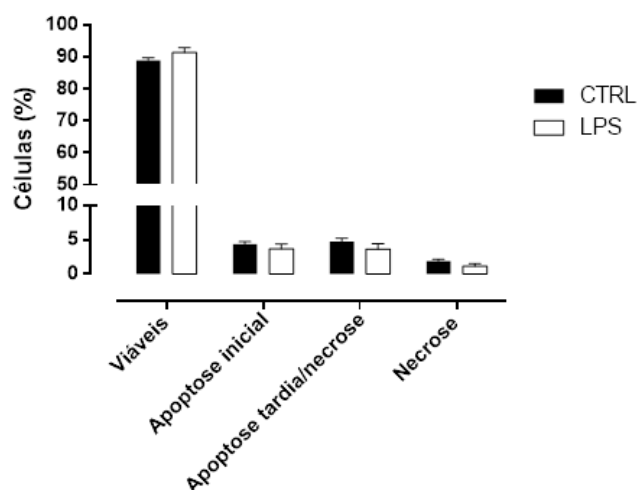


Figura 12: Viabilidade das CMLVs. CTRL: células controle; LPS: células submetidas a 48 horas de exposição ao LPS (1 µg/mL). Teste t, n=6. Dados representados pela média ± EPM.

5.2 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO GÊNICA DOS PERFIS CONTRÁTIL/SECRETÓRIO DA CMLVs PELO ESTÍMULO COM LPS

Foi avaliado se a exposição das CMLVs ao LPS poderia modular o perfil contrátil e/ou secretório destas células, para tal realizamos quantificação da expressão de genes de proteínas que quando presentes nas células caracterizam cada perfil.

Para estudar a presença de um perfil secretório, a análise de marcadores gênicos, colágeno 1 e vimentina, foi realizada, e, se constatou que expressão gênica destes foi elevada ($p < 0,05$) em 27% e 30%, respectivamente, após 24 horas de exposição ao LPS (1µg/mL) (Figura 13).

Ao avaliarmos os genes relacionados ao perfil contrátil, observamos que a exposição ao LPS também modificou a expressão gênica de uma proteína marcadora do perfil contrátil, a SM22 α , que teve aumento de 53% ($p < 0,05$).

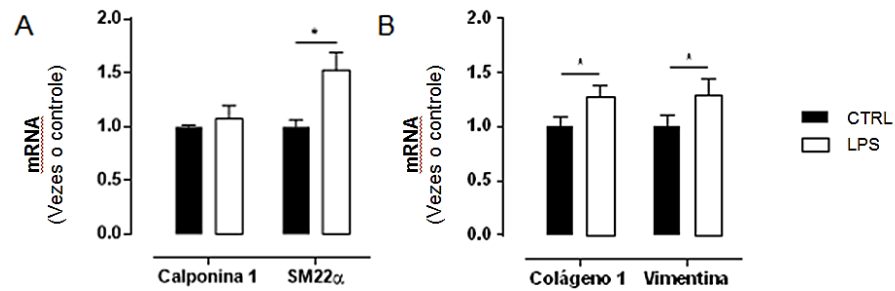


Figura 13: Efeito do LPS na expressão gênica de marcadores de perfis fenotípicos por CMLVs.

A: expressão de marcadores do perfil contrátil. B: expressão de marcadores do perfil secretório. CTRL: células controle. LPS: células submetidas a 24 horas de exposição ao LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). * $p < 0,05$, teste t, $n=6$. Dados representados por média \pm EPM.

Corroborando com os achados de que as CMLVs apresentaram um aumento na expressão gênica de marcadores do perfil secretório, observamos que CMLVs expostas ao LPS aumentaram a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, após 6 horas de estímulo (figura 14). O aumento ($p < 0,05$) das citocinas foi de 100% para a MCP-1, 380% para o TNF α , 794% para a IL-1 e 2410% para a IL-6.

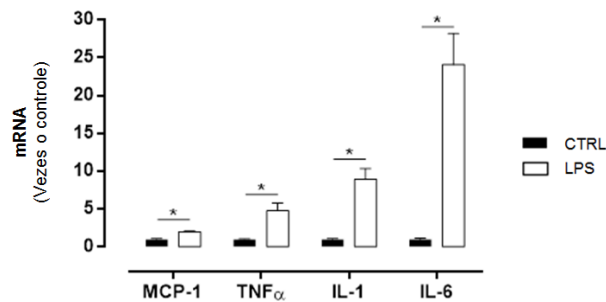


Figura 14: Efeito do LPS na expressão gênica de citocinas inflamatórias por CMLVs. CTRL: células controle. LPS: células submetidas a 6 horas de exposição ao LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). * $p < 0,05$, teste t, $n=6$. Dados representados por média \pm EPM.

Devido à elevada expressão gênica de IL-6 e por esta ser uma das citocinas estudadas por modificarem o fenótipo das CMLVs em resposta ao modelo de estimulação com LPS (Lee et al, 2016), avaliamos também a presença da proteína IL-6 em meio de cultura. Como pode ser observado na figura 15, as CMLVs aumentaram em 487% ($p < 0,05$) e 418% ($p < 0,05$) a produção de IL-6, após 24 horas e 48 horas de estímulo com o LPS ($1\mu\text{g/mL}$), respectivamente.

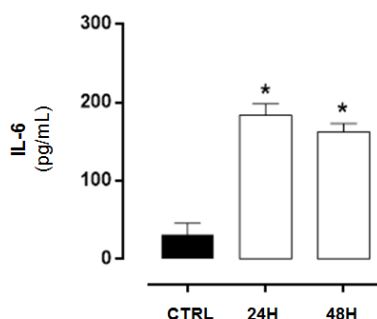


Figura 15: Efeito do LPS na produção de IL-6 pelas CMLVs. CTRL: células controle. 24H e 48H: células estimuladas por LPS ($1\mu\text{g/mL}$). * $p < 0,05$ vs CTRL, ANOVA uma via e *post-hoc* Bonferroni, $n=4$. Dados representados por média \pm EPM.

5.3 PRODUÇÃO CELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO PELAS CMLVs ESTIMULADAS POR LPS

É conhecido que a ativação do TLR4 pode aumentar a produção de NO por CMLVs, via ação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Heo et al, 2008). Assim, avaliamos se o LPS estava induzindo a produção de NO em nossos ensaios.

A exposição ao LPS aumentou a produção de NO pelas CMLVs (figura 16). O aumento foi de 8% ($p < 0,05$) após 8 horas de estímulo e de 52% ($p < 0,05$) após 24 horas de estímulo. Para comprovar se esta produção era feita via iNOS, a aminoguanidina, inibidor da iNOS, foi utilizada, e podemos observar que ele preveniu o aumento da liberação de NO pelas CMLVs em resposta ao LPS.

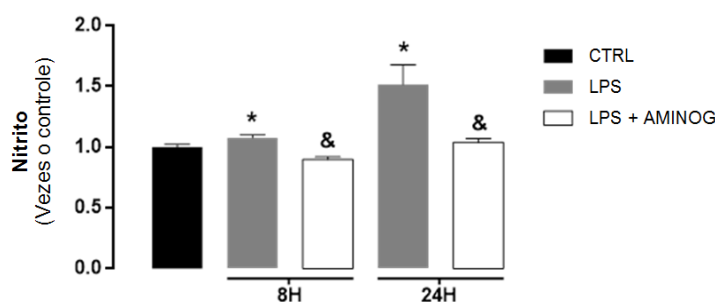


Figura 16: Efeito do LPS na produção de NO pelas CMLVs. CTRL: células controle. LPS: células estimuladas por LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). LPS + AMINOG: células incubadas com aminoguanidina a 1 mM 30 minutos antes do início da exposição de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * $p < 0,05$ vs CTRL, & $p < 0,05$ vs LPS de mesmo tempo, teste t, $n=4$. Dados representados por média \pm EPM.

5.4 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS FENÓTIPOS MIGRATÓRIO E CONTRÁTIL DAS CMLVs PELA ESTIMULAÇÃO AGUDA COM LPS

Para avaliação dos efeitos da exposição ao LPS sobre os fenótipos migratório e contrátil das CMLVs foram realizados dois tipos de incubações, a aguda e pré-condicionamento, como descrito na metodologia. A estimulação aguda procurou avaliar os fenótipos migratório e contrátil das CMLVs na presença do LPS no meio de cultura, caracterizando uma condição aguda de um evento séptico.

Os efeitos da estimulação aguda com LPS, foram analisados tanto no fenótipo de contração e migração celulares. Na figura 17 podemos observar que a exposição aguda das CMLVs ao LPS levou a redução de 61% ($p < 0,05$) e 20% ($p < 0,05$) na contração e migração, respectivamente.

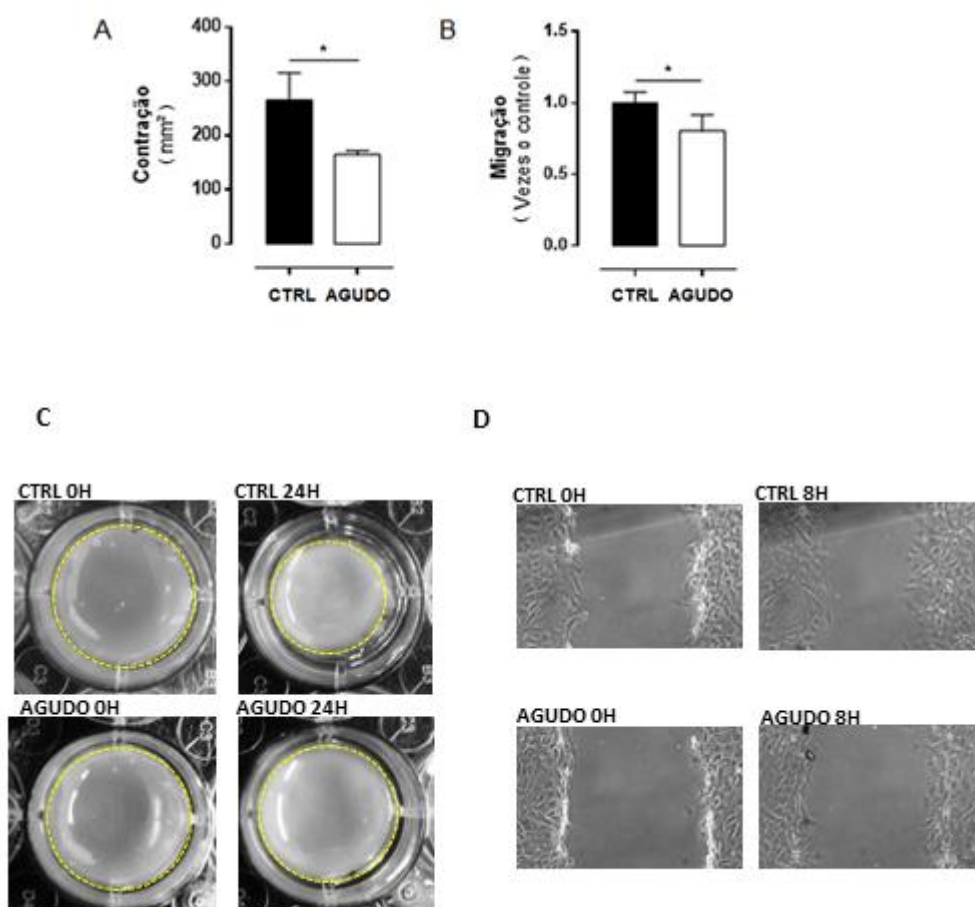


Figura 17: Efeitos do estímulo agudo com LPS em CMLVs. A: contração em gel de colágeno, 24 horas. B: Migração pelo método de *Wound-healing*, 8 horas. C: Imagens representativas do ensaio de contração em gel de colágeno. D: Imagens representativas do ensaio de migração. CTRL: células controle. AGUDO: células expostas ao LPS (1 μ g/mL) durante o ensaio. * $p < 0,05$, teste t, $n=4$. Dados representados por média \pm EPM.

A partir dos dados já demonstrados que a produção de NO está aumentada nas células CMLVs pela estimulação com LPS (figura 18) e que o NO é uma molécula chave nos eventos agudos de disfunção vascular na sepse (Burgdorff e Schumann, 2018), avaliamos se esta molécula poderia estar modulando os efeitos da estimulação aguda do LPS nas CMLVs. O bloqueio do NO pela aminoguanidina preveniu as reduções na contração e migração causadas pelo estímulo agudo com LPS (figura 19A e B) nos tempos de 24 horas e 8 horas de estímulo, respectivamente.

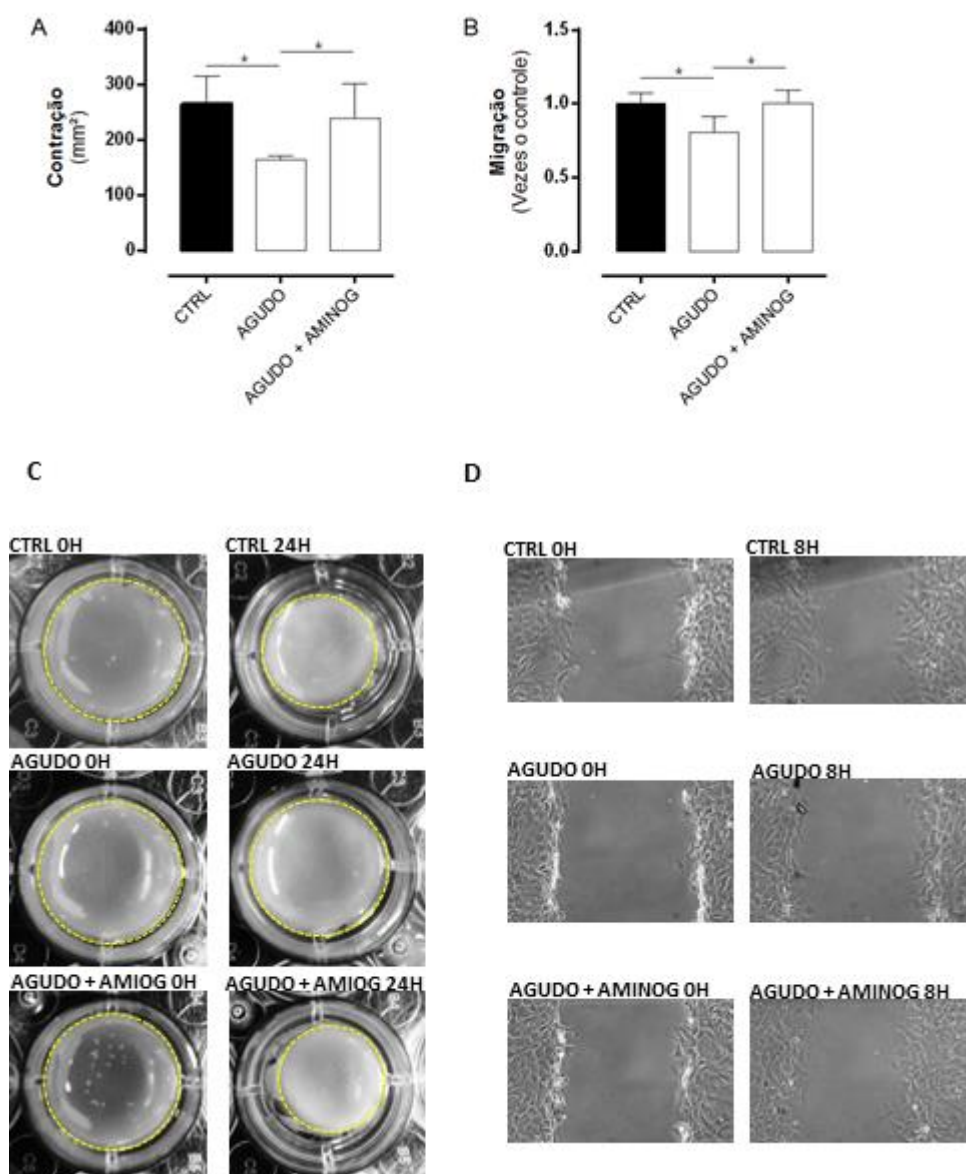


Figura 18: Ação da aminoguanidina na estimulação aguda de CMLVs com LPS. A: contração em gel de colágeno, 24 horas. B: Migração pelo método de *Wound-healing*, 8 horas. C: Imagens representativas do ensaio de contração em gel de colágeno. D: Imagens representativas do ensaio de migração. CTRL: células controle. AGUDO: células expostas ao LPS (1 μ g/mL) durante o ensaio. AGUDO + AMINO G: células expostas a aminoguanidina a 1 mM e ao LPS (1 μ g/mL) durante o ensaio (a aminoguanidina foi adicionada ao meio de cultura 30 minutos antes que o LPS). * $p < 0,05$, ANOVA uma via e *post-hoc* Bonferroni, $n=4$. Dados representados por média \pm EPM.

5.5 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS FENÓTIPOS MIGRATÓRIO E CONTRÁTIL DAS CMLVs PELO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM LPS

Por fim, avaliamos os efeitos do pré-condicionamento das CMLVs pelo LPS sobre o fenótipo contrátil e migratório com o objetivo de observar se mesmo após a suspensão do estímulo as células manteriam alterações em seus fenótipos.

A figura 19 mostra os efeitos do pré-condicionamento com LPS, por 48 horas, sobre a contratilidade (figura 19A) e, por 24 horas, sobre a migração (figura 19B). O pré-condicionamento das CMLVs com LPS, sem a manutenção do estímulo durante os ensaios, aumentou o potencial contrátil em 155% ($p < 0,05$) avaliado após 24 horas do início do ensaio e o migratório em 16% ($p < 0,05$) avaliado após 8 horas do início do ensaio.

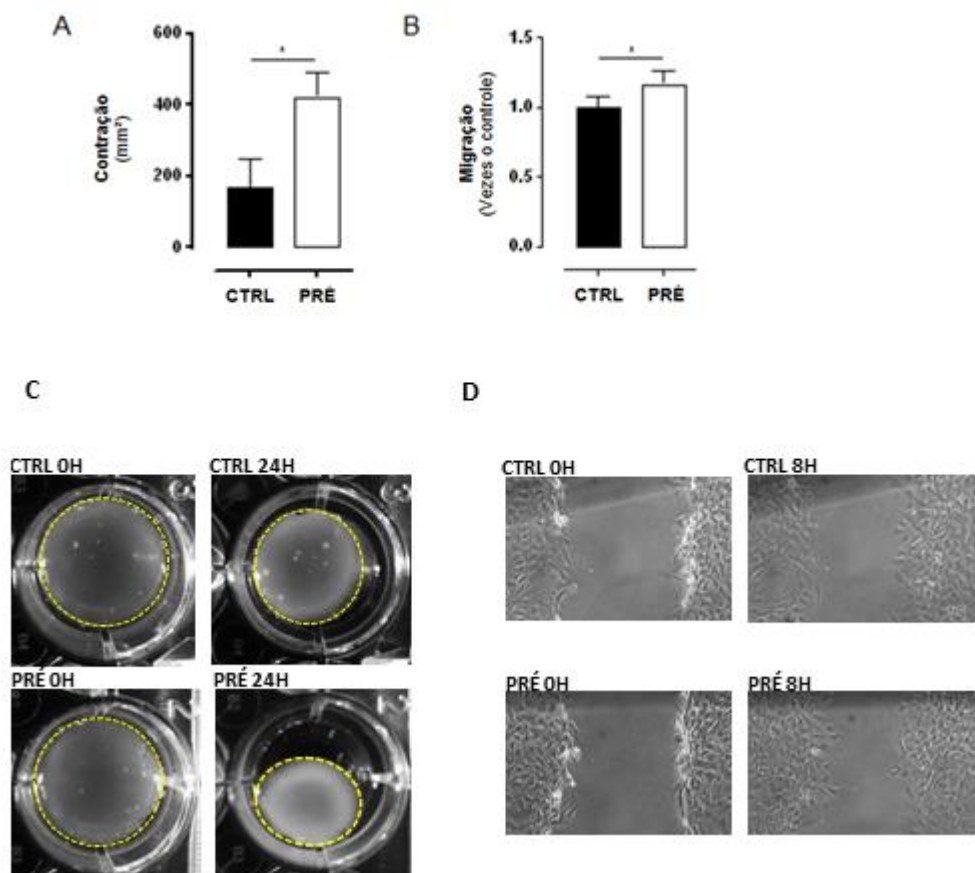


Figura 19: Efeitos do pré-condicionamento com LPS em CMLVs. A: pré-condicionamento por 48 horas seguido de ensaio de contração em gel de colágeno por 24 horas. B: pré-condicionamento por 24 horas seguido do ensaio de migração pelo método de *Wound-healing* por 8 horas. C: Imagens representativas do ensaio de contração em gel de colágeno. D: Imagens representativas do ensaio de

migração. CTRL: células controle. PRÉ: células pré-condicionadas com LPS (1µg/mL) *p < 0,05, teste t, n=4. Dados representados por média ± EPM.

A partir dos achados mencionados acima que após a suspensão do estímulo com LPS são observadas alterações na migração e contração, mas estas são opostas as encontradas na condição de estimulação aguda, optamos por avaliar se o citocina inflamatória IL-6 poderia ser a responsável por estes achados, devido a participação desta citocina no desenvolvimento, a longo prazo, de doenças cardiovasculares no contexto inflamatório (Golia et al, 2014), e, devido a sua ação descrita na modulação de fenótipo das CMLVs (Lee et al, 2016)

A utilização de um anticorpo bloqueador do receptor de IL-6, o tocilizumabe, preveniu os aumentos nas respostas contrátil e migratória ocasionado pelo pré-condicionamento das CMLVs com LPS (figura 20A e B) a valores semelhantes a condição controle.

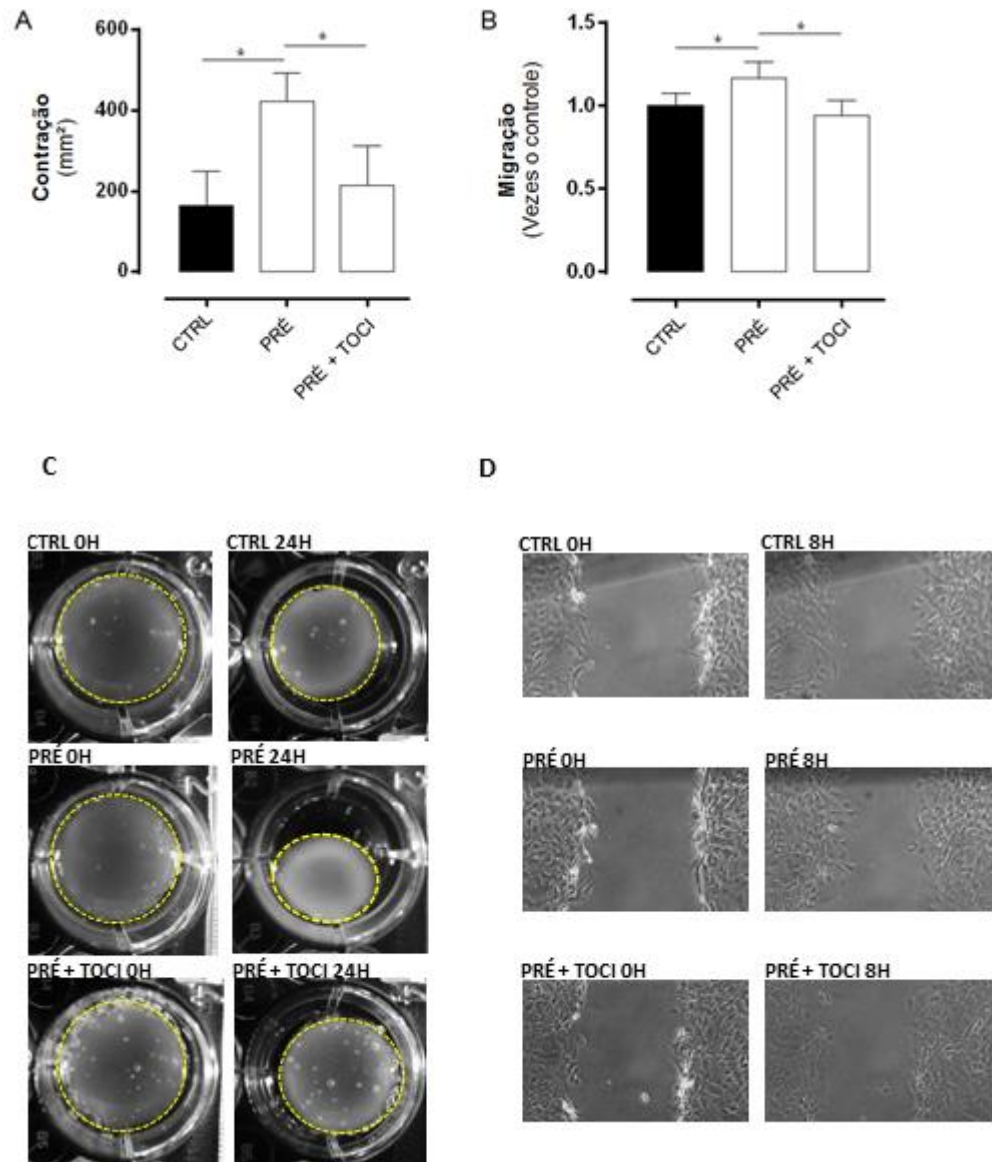


Figura 20: Ação do tocilizumabe no pré-condicionamento de CMLVs com LPS. A: pré-condicionamento por 48 horas seguido de ensaio de contração em gel de colágeno por 24 horas. B: pré-condicionamento por 24 horas seguido do ensaio de migração pelo método de *Wound-healing* por 8 horas. C: Imagens representativas do ensaio de contração em gel de colágeno. D: Imagens representativas do ensaio de migração. CTRL: células controle. PRÉ: células pré-condicionadas com LPS (1µg/mL). PRÉ + TOCI: células pré-condicionadas com tocilizumabe 100µg/mL e LPS (1µg/mL), (o tocilizumabe foi adicionado ao meio de cultura 30 minutos antes que o LPS). * $p < 0,05$, ANOVA uma via e *post-hoc* Bonferroni, $n=4$. Dados representados por média \pm EPM.

6 DISCUSSÃO

Nossos dados evidenciaram que a estimulação de CMLVs com LPS foi capaz de modular o fenótipo destas células, gerando respostas específicas de acordo com a condição em que ocorreu o estímulo. Inicialmente, o LPS foi capaz de modular o perfil secretório das CMLVs, evidenciado pela a expressão gênica aumentada de colágeno I e vimentina e também do perfil contrátil pelo aumento de SM22 α . Este perfil secretório ficou caracterizado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, MCP-1, TNF α , IL-1 e IL-6, além do aumento de NO. Em resposta ao estímulo agudo com o LPS, as CMLVs apresentaram reduções na contração e na migração celular, e, em resposta ao pré-condicionamento com LPS, seguido da remoção do estímulo, as células apresentaram aumentos na contração e na migração celular. Na estimulação aguda, a inibição da iNOS, foi capaz de reverter as reduções na contração e migração causadas pelo LPS, evidenciando que estas reduções são mediadas pela ação do NO. Já no pré-condicionamento, a inibição do receptor de IL-6 das CMLVs foi eficiente em reverter os aumentos na contração e migração, evidenciando que tais aumentos são dependentes da ação desta citocina.

As elevações na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, e na produção de IL-6 e NO pelas CMLVs, mostram que o LPS conduz estas células a um perfil mais secretório. O que é afirmado pelo aumento na expressão gênica das CMLVs de proteínas que são marcadoras do perfil secretório, colágeno 1 e vimentina, em resposta a estimulação com o LPS. O LPS também foi capaz de aumentar a expressão gênica de uma proteína marcadora do fenótipo contrátil, a SM22 α (Owens, 1995; Beamish et al, 2010). É interessante destacar que a transição entre perfis contrátil/secretório pelas CMLVs não é dicotômica, ou seja, tais células podem apresentar simultaneamente características fenotípicas que são atribuídas a um perfil ou outro, conforme os estímulos que recebem (Owens et al, 2004).

A SM22 α é uma proteína de citoesqueleto acessória que induz a polimerização de filamentos de actina e organização de citoesqueleto, contribuindo para a contratilidade e em consequência, mobilidade das CMLVs, inclusive em situações em que estas células estão sendo estimuladas a dediferenciação, atuando como

mecanismo de preservação da função contrátil das CMLVs (Winder et al, 2003; Han et al, 2008)

Outros autores também constataram a capacidade do LPS em induzir características do perfil secretório em CMLVs, através da mensuração da produção de citocinas. Meng et al (2013) utilizando CMLVs de ratos observaram aumento na produção de TNF α e MCP-1, via ELISA, após 24 horas de estimulação com LPS (1 μ g/mL), e atribuíram este aumento a ativação do NF- κ B, um fator de transcrição correlacionado ao aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Leimgruber et al (2011), mostraram que CMLVs de ratos quando expostas ao LPS aumentaram a expressão proteica de TLR4, de maneira dose dependente, após 24 horas de exposição (LPS a 1 e 10 μ g/mL), a ativação de NF κ B, após 10 minutos (LPS a 1 μ g/mL), e a produção das citocinas TNF α e IL-6, de maneira tempo e dose dependente após 24 ou 48 horas de exposição (LPS a 1 e 10 μ g/mL). Outro achado destes autores é a constatação de que o LPS (1 e 10 μ g/mL) modulou a expressão proteica de marcadores fenotípicos avaliados também em nosso estudo, com a redução da expressão gênica de calponina e aumento da vimentina, após 24 horas de exposição. Estes achados também foram descritos utilizando CMLVs humanas onde foi observado aumento na produção de MCP-1 e IL-1 α , via ELISA, após estímulo com LPS (10ng/mL) por 6 horas (Yang et al (2005), e, o aumento da produção de TNF α , via ELISA, após 24 horas de estimulação com LPS (1 μ g/mL) (Sun e Ding, 2012).

As alterações causadas nas CMLVs pelo LPS, que são determinantes a caracterização dos perfis celulares, se traduzem em modificações nas funções destas células. A este respeito, as diferentes formas de incubação com o LPS (1 μ g/mL) usadas neste trabalho, aguda ou pré-condicionamento, acarretaram em modificações opostas nos fenótipos contrátil e migratório das CMLVs.

A estimulação aguda com LPS causou reduções na contração e migração das CMLVs. Este efeito parece ser dependente da produção de NO pela CMLVs pois foi revertido na presença do bloqueador de iNOS, aminoguanidina. A iNOS é a isoforma da óxido nítrico sintase envolvida na produção de NO em processos inflamatórios (Lind et al, 2017). Outros trabalhos já descreveram que o LPS em diferentes

concentrações pode desencadear a produção de NO por CMLVs via ação da iNOS. (100ng/mL - Yang et al, 2014; 100µg/mL - Oyagbemi et al, 2016). Além disto, estudos *in vitro* demonstraram que o NO atua reduzindo a contração e migração de CMLVs. Dubey et al (1995) utilizando CMLVs de ratos, observaram que diferentes doadores de NO (SNAP, SNP e 8-bromo-cGMP) reverteram o aumento de migração causado pela exposição destas células a angiotensina II, utilizando a técnica de *Boyden chamber*. De Oliveira et al (2007) evidenciaram que CMLVs, provenientes de aorta de coelhos, apresentaram reversão parcial da elevação na migração causada pelo fator de crescimento derivado de plaquetas, quando expostas a um doador de NO (cyclamNO) após 16 horas de ensaio, utilizando a técnica de *Wound-healing*.

Adicionalmente, Li et al (1997), mostraram que o LPS (10 ng/mL), após 6 horas de estímulo, foi suficiente para tornar as CMLVs hipocontráteis, via ação do NO produzido via iNOS, que também teve sua expressão aumentada em resposta ao estímulo com o LPS a partir de 6 horas. Neste trabalho os autores utilizaram CMLVs provenientes de ratos cultivadas em placas pré-tratadas com Matrigel, que é um material biologicamente ativo que se assemelha a matriz extracelular de mamíferos, e, a contratilidade das CMLVs foi obtida pela comparação da área celular antes e após estimulação. Em conjunto, os dados da literatura corroboram com nossos achados que em presença de LPS as CMLVs apresentaram redução de migração e contração celular e que estes efeitos parecem ser modulados pelo NO.

Sarkar et al (1996) demonstraram que o efeito do NO sobre a inibição da migração das CMLVs parece ocorrer de maneira reversível. A exposição de CMLVs de rato, a doadores de NO foi capaz de reduzir a capacidade migratória destas células, após 48 horas de ensaio, entretanto quando as CMLVs foram pré-incubadas com doadores de NO por 48 horas e o estímulo era removido para o ensaio, a redução de migração não era mais observada, não havendo diferença na migração destas células em relação ao controle. Estes dados sugerem novamente que o NO parece ser o responsável pelos nossos achados com a estimulação aguda de LPS, e talvez auxilie na compreensão, pelo menos parcialmente, do porque estas alterações não permaneceram na condição de pré-condicionamento com LPS. Além disto, outras alterações geradas nas células musculares lisas pelo LPS podem

interferir na contratilidade destas células. Indo além do modelo experimental utilizado neste estudo, foi observado que a estimulação com LPS promoveu redução capacidade contrátil de células musculares lisas contráteis, devido a aumento da atividade pró-oxidante, modificação na rede de microfilamentos contráteis, indução do ciclo celular e dediferenciação destas células a um perfil secretório (Matarrese et al, 2012; Tattoli et al, 2012). Corroborando com estes dados, Pasqueletti et al (2014) evidenciaram que a ação de um antioxidante reduziu o comprometimento contrátil das células musculares lisas entéricas causadas pelo LPS. Devido a este potencial do LPS em modular a produção de radicais livres e estes também e estes estarem correlacionados com a modulação da rede de miofilamentos contráteis, pode ocorrer interferência dos radicais livres nas modificações de que observamos em nossos experimentos, contribuindo para a redução da contratilidade e migração na estimulação aguda, e, talvez gerando estímulo para as adaptações celulares que causarão o aumento de contratilidade e migração encontrado após estimulação crônica.

Além das citocinas inflamatórias, as anti-inflamatórias também podem modificar a contratilidade das células musculares lisas vasculares, como a interleucina 10, que tem ação de restaurar a reatividade vascular após a hiporresponsividade induzida pelo LPS (Mostefai et al, 2013), assim a ação desta citocina pode estar contribuindo para a reversão dos efeitos agudos da estimulação com LPS por nós encontrados de modo que não interfiram nos resultados encontrados após pré-condicionamento.

Nossos resultados evidenciaram que quando as CMLVs foram pré-condicionadas com LPS, sem que houvesse a manutenção do estímulo durante os ensaios, estas células apresentaram aumentos na contração e migração, de maneira dependente a ação da IL-6, visto que estes aumentos foram prevenidos pela ação do tocilizumabe, um anticorpo inibidor do receptor da IL-6. Interleucina esta, que em nossos ensaios teve sua produção elevada após 24 e 48 horas de estímulo com o LPS (1µg/mL).

Outros autores relataram que a IL-6 promove alterações no citoesqueleto de CMLVs, que culminam em modificar o fenótipo migratório destas células. Wang et al (2003) evidenciaram que a IL-6 (0,1; 1 e 10 ng/mL) estimulou a migração de CMLVs de ratos, de maneira dose dependente, após 15 horas de experimento utilizando a

técnica de *boyden chamber*, sendo este aumento dependente da maior polimerização de filamentos de actina causada pela IL-6. Lee et al (2016) mostraram que o estímulo com LPS (100 ng/mL), após 24 horas, aumentou a produção de IL-6 por CMLVs de camundongos, e que este aumento foi essencial para o aumento na migração destas células, na técnica de *boyden chamber*, por aumentar a polimerização de filamentos de actina, filamentos estes que são requeridos nos processos de contração e migração celular (Sandbo et al, 2007).

Conforme relatado no segundo e terceiros parágrafos desta discussão, o LPS (1µg/mL) foi capaz de aumentar a expressão gênica da SM22α, uma proteína marcadora do fenótipo contrátil que atua como mecanismo de manutenção da função contrátil das CMLVs, estimulando a polimerização de filamentos de actina (Winder et al, 2003, Han et al, 2008). Sobre isto, dados da literatura também discorreram a cerca da participação da SM22α na contratilidade celular, utilizando camundongos SM22α *-/-*. Zeidan et al (2004), evidenciaram que o conteúdo de actina em artérias mesentéricas destes camundongos é de 10 a 25% menor, e, que estas artérias apresentavam contratilidade em resposta ao potássio 40% menor que artérias mesentéricas de animais selvagens.

Estes dados sugerem que a SM22α possa estar contribuindo, via sua ação sobre a actina, nos aumentos da contração e migração, dependentes de IL-6, promovidos pela pré-incubação com LPS, realizada em nosso estudo. Acreditamos que após a retirada do estímulo, feita em seguida a pré-incubação com o LPS, a interferência direta do NO nos ensaios tenha se findado, visto que como relatado no estudo de Sarkar et al (1996) (oitavo parágrafo desta discussão), a ação do NO é reversível, logo, ao se encerrar o estímulo com LPS a produção e ação do NO também se encerrariam.

Em contrapartida, é possível que as ações da IL-6 na modificação de citoesqueleto, que possivelmente acarretaram nos aumentos da contração e migração observadas após pré-condicionamento com LPS, também tenham interferido nos resultados da estimulação aguda, visto que CMLVs após 3 horas de exposição ao LPS (100 ng/mL) já apresentam aumento na sua produção de IL-6, característica do perfil secretório (Liu et al, 2010). No entanto é possível que a ação

do NO tenha sobrepujado as ações da IL-6 na estimulação aguda, ficando estas ações evidentes somente nos ensaios após pré-condicionamento e retirada do estímulo. Para melhor esclarecimento destes achados são necessários mais experimentos que infelizmente não possível realizamos em tempo hábil.

Dentre os mecanismos que podem estar colaborando para estas modificações fenotípicas causadas pelo LPS após a remoção do estímulo, podemos citar os mecanismos epigenéticos de modulação da expressão gênica, que embora não abordados neste trabalho tem sido abordados em diferentes publicações, seja sobre o papel que apresentam na sepse (Kingsley e Bhat, 2017; Poll et al, 2017) ou na modulação do perfil fenotípico das CMLVs (Alexander e Owens, 2012; Clifford et al, 2013).

Os resultados obtidos neste trabalho trazem importantes elucidações a cerca dos possíveis mecanismos que podem modificar o funcionamento das CMLVs de forma a contribuir com as alterações vasculares agudas, percebidas na sepse, e com os eventos cardiovasculares no pós sepse. Nosso trabalho avaliou a expressão dos perfis fenotípicos das CMLVs em resposta ao LPS, considerando os fenótipos contrátil, migratório e secretório destas células, sob diferentes condições de incubação, aguda e via pré-condicionamento, evidenciando a complexidade da resposta das CMLVs ao LPS. A avaliação do perfil contrátil das CMLVs frente à estimulação com LPS, utilizando o ensaio de contração em gel de colágeno, é uma inovação deste trabalho, visto que este dado não consta na literatura. Além disto, o fato do trabalho avaliar o resultado das diferentes condições de incubação com LPS evidenciou que as CMLVs podem apresentar respostas divergentes a diferentes incubações. O que pode trazer uma nova percepção de como as alterações vasculares associadas à sepse podem contribuir no aumento do risco cardiovascular de sobreviventes a sepse.

No entanto, nosso trabalho apresenta limitações experimentais, que ao decorrer desta discussão se apresentaram na forma de lacunas que foram preenchidas, quando possível, por outros trabalhos já publicados, de modo a conjecturar os mecanismos subjacentes aos resultados por nós obtidos. Dentre as limitações podemos citar: não avaliamos por meio de ensaios de contração e migração a participação da IL-6 nos experimentos com estimulação aguda, e a

participação do NO nos experimentos após pré-condicionamento e remoção do estímulo, o que é importante mesmo que a literatura aponte a ação do NO como reversível. Além disto, não foram feitos ensaios que avaliassem a expressão proteica da SM22 α e de actina, proteínas chave para a explicação de nossos resultados.

7 CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram que o LPS exerce efeitos nos fenótipos secretório, contrátil e migratório das CMLVs (Figura 21) e estes efeitos podem durar mesmo após a interrupção do estímulo. Na estimulação aguda, o NO teve importante papel na redução da migração e contração das CMLVs. Nos ensaios conduzidos após pré-condicionamento, a IL-6 teve papel fundamental na elevação da contração e migração das CMLVs, provavelmente devido a atuação desta citocina na organização de citoesqueleto. Estes resultados sugerem que as respostas das CMLVs ao LPS podem contribuir para a fisiopatologia da sepse, devido principalmente as ações do LPS agudo, e para a ocorrência de eventos cardiovasculares, devido às ações do LPS evidenciadas pelo pré-condicionamento.

Como perspectivas futuras, para melhor fundamentação da conclusão, está a realização de experimentos que venham sanar as limitações deste trabalho, descritas na discussão, como por exemplo, realizar a avaliação das drogas, aminoguanidina e tocilizumab, nos tempos inversos aos que foram empregados em nossa metodologia. Aumentando assim o entendimento da modulação do LPS sobre as CMLVs. Em seguida, outros mecanismos de modificação fenotípica das CMLVs podem ser estudados, como os epigenéticos, que podem estar contribuindo com a modulação da expressão das fibras contráteis mesmo após o encerramento do estímulo com o LPS. Além disto, a utilização de modelo experimental de sepse (CLP), realizado no intuito de que os animais submetidos à sepse sobrevivam e apresentem alterações cardiovasculares, é fundamental para avaliação de como resultados obtidos *in vitro* neste trabalho se correlacionam com possíveis alterações pós-sepse *in vivo*.

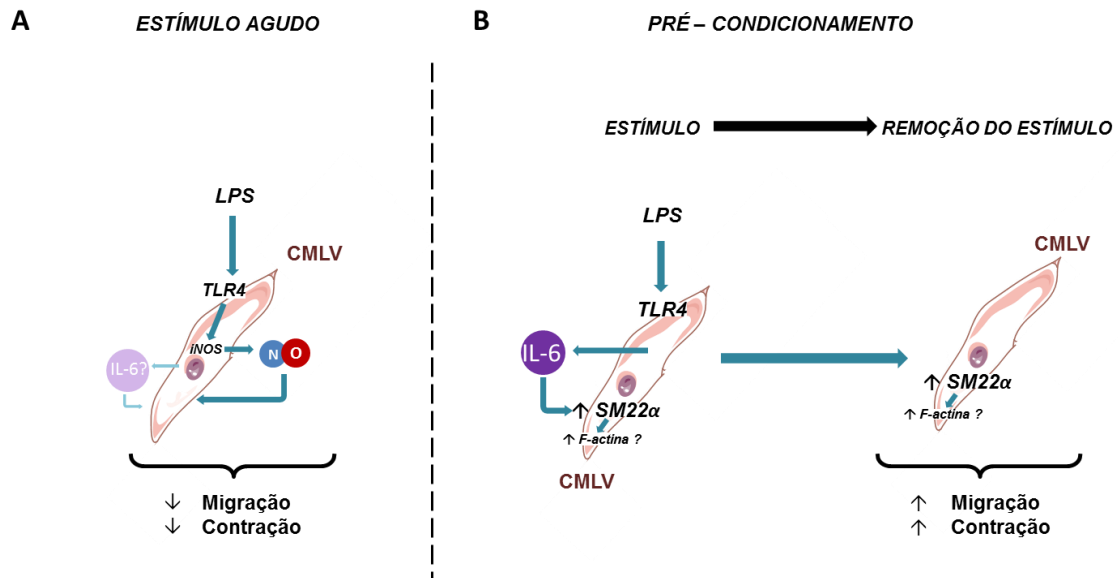


Figura 21: Modelo hipotético representativo da ação do LPS em CMLVs. A – Representação da ação do LPS na estimulação aguda. O LPS via TLR4, estimula as CMLVs a atividade secretória, que culmina na produção de mediadores inflamatórios como o NO, que é produzido via iNOS. O NO, via ações autócrina e parácrina, leva a reduções na migração e contração das CMLVs. B – Representação da ação do pré-condicionamento com LPS seguido da remoção do estímulo. Além do NO, na vigência do estímulo com o LPS as CMLVs secretam IL-6. Citocina com conhecida ação na modulação de citoesqueleto das CMLVs e pode estar mediando o aumento na expressão de SM22 α , molécula esta que promove a polimerização de filamentos de actina, os quais são necessários à migração e contração celular. Após a remoção do estímulo a possível modulação de citoesqueleto ainda se mantém, propiciando aumento nos fenótipos migratório e contrátil das CMLVs.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, Matthew R; OWENS, Gary K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annual review of physiology*, v. 74, p. 13–40, 2012.
- BEAMISH, Jeffrey A *et al.* Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 16, n. 5, p. 467–491, out. 2010. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2009.0630>>.
- BERTHET, Julien *et al.* Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, v. 145, n. 3, p. 189–200, dez. 2012.
- BOEHME, Amelia K *et al.* Risk of Acute Stroke After Hospitalization for Sepsis: A Case-Crossover Study. *Stroke*, v. 48, n. 3, p. 574–580, mar. 2017.
- BRUN-BUISSON, Christian *et al.* The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Medicine*, v. 29, n. 9, p. 1464–1471, 1 set. 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00134-003-1877-x>>.
- BURGDORFF, A.-M.; BUCHER, M.; SCHUMANN, J. Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. *Journal of International Medical Research*, v. 46, n. 4, p. 1303–1310, 14 abr. 2018. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300060517743836>>.
- CINEL, Ismail; OPAL, Steven M. Molecular biology of inflammation and sepsis: A primer*. *Critical Care Medicine*, v. 37, n. 1, p. 291–304, jan. 2009. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00003246-200901000-00040>>.
- CLIFFORD, Rachel L; SINGER, Cherie A; JOHN, Alison E. Epigenetics and miRNA emerge as key regulators of smooth muscle cell phenotype and function. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, v. 26, n. 1, p. 75–85, fev. 2013.
- COHEN, J; EVANS, T J; SPINK, J. Cytokine regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Progress in clinical and biological research*, v. 397, p. 169–177, 1998.
- DE BATISTA, Priscila R. *et al.* Toll-Like Receptor 4 Upregulation by Angiotensin II Contributes to Hypertension and Vascular Dysfunction through Reactive Oxygen Species Production. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, p. e104020, 5 ago. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104020>>.
- DE OLIVEIRA, Mariana G *et al.* Phenotypic switching prevention and proliferation/migration inhibition of vascular smooth muscle cells by the ruthenium nitrosyl complex trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 69, n. 9, p. 1155–1165, set. 2017.
- DE SOUZA, Priscila *et al.* Impaired vascular function in sepsis-surviving rats mediated by oxidative stress and Rho-Kinase pathway. *Redox Biology*, v. 10, n. September, p. 140–147, dez. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.016>>.
- DEETJEN, C *et al.* Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells by granulocyte-colony stimulating factor in vitro. *Immunopharmacology*, v. 43, n. 1, p. 23–30, jun. 1999.
- DESHMANE, Satish L *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, v. 29, n. 6, p. 313–326, jun. 2009.
- DINARELLO, C A. Interleukin-1. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 8, n. 4, p. 253–265, dez. 1997.
- DUBEY, R K; JACKSON, E K; LÜSCHER, T F. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors. *Journal of Clinical Investigation*, v. 96, n. 1, p. 141–149, 1 jul. 1995. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/118014>>.

- FERNANDES, Daniel; ASSREUY, Jamil. NITRIC OXIDE AND VASCULAR REACTIVITY IN SEPSIS. *Shock*, v. 30, n. Suppl 1, p. 10–13, out. 2008. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200810001-00003>>.
- FLEISCHMANN, Carolin *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 193, n. 3, p. 259–272, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201504-0781OC>>.
- FRANTZ, Stefan; ERTL, Georg; BAUERSACHS, Johann. Mechanisms of Disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, v. 4, n. 8, p. 444–454, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncpcardio0938>>.
- FULLER, Catherine M; BENOS, Dale J. Putting the brakes on vascular smooth muscle cell migration. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 294, n. 5, p. H1987–H1988, maio 2008. Disponível em: <<http://ajpheart.physiology.org/content/294/5/H1987.short>>.
- GALLEY, H.F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British Journal of Anaesthesia*, v. 107, n. 1, p. 57–64, 1 jul. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bja/article-lookup/doi/10.1093/bja/aer093>>.
- GAO, Ming *et al.* Attenuation of Cardiac Dysfunction in Polymicrobial Sepsis by MicroRNA-146a Is Mediated via Targeting of IRAK1 and TRAF6 Expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 195, n. 2, p. 672–682, jul. 2015.
- GOLDMAN, Jeremy; ZHONG, Lin; LIU, Shu Q. Negative regulation of vascular smooth muscle cell migration by blood shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 49931, p. 928–938, 2007.
- GOLIA, Enrica *et al.* Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. *Current atherosclerosis reports*, v. 16, n. 9, p. 435, set. 2014.
- GOODWIN, Andrew J *et al.* Frequency, cost, and risk factors of readmissions among severe sepsis survivors. *Critical care medicine*, v. 43, n. 4, p. 738–746, abr. 2015.
- GOTTS, Jeffrey E; MATTHAY, Michael A. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*, v. 353, p. i1585, 23 maio 2016. Disponível em: <<http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.i1585>>.
- GRIESS, Peter. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 12, n. 1, p. 426–428, jan. 1879. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cber.187901201117>>.
- GUNST, Susan J; ZHANG, Wenwu. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 295, n. 3, p. C576-87, set. 2008. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00253.2008>>.
- HAN, Mei *et al.* Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling. *Life sciences*, v. 84, n. 13–14, p. 394–401, mar. 2009.
- HENDRIKS-BALK, M C *et al.* LPS differentially affects vasoconstrictor responses: a potential role for RGS16? *Journal of physiology and biochemistry*, v. 65, n. 1, p. 71–83, mar. 2009.
- HEO, Sook-Kyoung *et al.* LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production. *Immunology letters*, v. 120, n. 1–2, p. 57–64, out. 2008.
- HOREWICZ, Veronica Vargas *et al.* FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. *European journal of pharmacology*, v. 746, p. 267–273, jan. 2015.
- HOTCHKISS, Richard S *et al.* Sepsis and septic shock. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, n. June, p. 16045, 30 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201645>>.
- HUNTER, Christopher A; JONES, Simon A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology*, v. 16, n. 5, p. 448–457, maio 2015.
- IDRISS, H T; NAISMITH, J H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function

relationship(s). *Microscopy research and technique*, v. 50, n. 3, p. 184–195, ago. 2000.

IWASHYNA, Theodore J *et al.* Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. *JAMA*, v. 304, n. 16, p. 1787, 27 out. 2010. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2010.1553>>.

IWASHYNA, Theodore J; ANGUS, Derek C. Declining Case Fatality Rates for Severe Sepsis. *JAMA*, v. 311, n. 13, p. 1295, 2 abr. 2014. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2014.2639>>.

JAFARZADEH, S Reza *et al.* Longitudinal Study of the Effects of Bacteremia and Sepsis on 5-year Risk of Cardiovascular Events. *Clinical Infectious Diseases*, v. 63, n. 4, p. 495–500, 15 ago. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciw320>>.

JIANG, Hong-Ni *et al.* Lipopolysaccharide potentiates endothelin-1-induced proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells by upregulating TRPC channels. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, v. 82, p. 20–27, ago. 2016.

JOHNSON, Jason Lee. Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis. *Cardiovascular research*, v. 103, n. 4, p. 452–460, set. 2014.

KANG, Kai *et al.* Dexmedetomidine protects against lipopolysaccharide-induced sepsis-associated acute kidney injury via an $\alpha 7$ nAChR-dependent pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 106, n. 150, p. 210–216, out. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.059>>.

KAUKONEN, Kirsi-Maija *et al.* Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA*, v. 311, n. 13, p. 1308, 2 abr. 2014. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2014.2637>>.

KIDACHI, Yumi *et al.* Interferon-gamma and lipopolysaccharide stimulation increases matrix metalloproteinase-9 expression and enhances invasion activity in ras/myc-transformed serum-free mouse embryo cells. *Cell biology international*, v. 31, n. 12, p. 1511–1517, dez. 2007.

KINGSLEY, S Manoj Kumar; BHAT, B Vishnu. Role of microRNAs in sepsis. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, v. 66, n. 7, p. 553–569, jul. 2017.

KLEIN, S M *et al.* Effect of tyrosine kinase inhibition on sepsis-induced vascular hyporesponsiveness, inos mrna expression and NF-kappaB nuclear translocation in rats. *Shock (Augusta, Ga.)*, v. 14, n. 5, p. 544–549, nov. 2000.

KUZMICH, Nikolay *et al.* TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines*, v. 5, n. 4, p. 34, 4 out. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-393X/5/4/34>>.

LACOLLEY, Patrick *et al.* The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovascular Research*, v. 95, n. 2, p. 194–204, 15 jul. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cardiovasres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvs135>>.

LAGU, Tara *et al.* Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Critical Care Medicine*, v. 40, n. 3, p. 754–761, mar. 2012. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00003246-201203000-00007>>.

LEE, G.-L. *et al.* TLR 2 Induces Vascular Smooth Muscle Cell Migration Through cAMP Response Element-Binding Protein-Mediated Interleukin-6 Production. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 32, n. 11, p. 2751–2760, 1 nov. 2012. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.112.300302>>.

LEE, Guan-Lin; WU, Jing-Yiing; TSAI, Chien-Sung; *et al.* TLR4-Activated MAPK-IL-6 Axis Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Function. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 9, p. 1394, 24 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/9/1394>>.

LEE, Guan-Lin; WU, Jing-Yiing; YEH, Chang-Ching; *et al.* TLR4 induces CREB-mediated IL-6 production via upregulation of F-spondin to promote vascular smooth muscle cell migration. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 473, n. 4, p. 1205–1210, maio 2016.

LEE, Helen *et al.* Detailed cost analysis of care for survivors of severe sepsis. *Critical care medicine*, v. 32, n. 4, p. 981–5, abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15071389>>.

- LEIMGRUBER, Carolina *et al.* Dedifferentiation of prostate smooth muscle cells in response to bacterial LPS. *The Prostate*, v. 71, n. 10, p. 1097–1107, jul. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pros.21322>>.
- LEON, Carlos G. *et al.* Discovery and Development of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Antagonists: A New Paradigm for Treating Sepsis and Other Diseases. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 8, p. 1751–1761, 21 ago. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11095-008-9571-x>>.
- LEVI, Marcel; VAN DER POLL, Tom. Coagulation and sepsis. *Thrombosis Research*, v. 149, p. 38–44, jan. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384816306193>>.
- LI, S; FAN, S X; MCKENNA, T M. Vascular smooth muscle cells on Matrigel as a model for LPS-induced hypocontractility and NO formation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 272, n. 1, p. H576–H584, jan. 1997. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.1997.272.1.H576>>.
- LI, Youe *et al.* BK channels regulate myometrial contraction by modulating nuclear translocation of NF-kappaB. *Endocrinology*, v. 155, n. 8, p. 3112–3122, ago. 2014.
- LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329–333, 1 fev. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2007.30>>.
- LIND, Maggie *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, v. 93, p. 370–375, set. 2017.
- LINDER, Adam *et al.* Long-term (10-year) mortality of younger previously healthy patients with severe sepsis/septic shock is worse than that of patients with nonseptic critical illness and of the general population. *Critical care medicine*, v. 42, n. 10, p. 2211–2218, out. 2014.
- LIU, Na *et al.* C-reactive protein triggers inflammatory responses partly via TLR4/IRF3/NF-kB signaling pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sciences*, v. 87, n. 11–12, p. 367–374, set. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002432051000319X>>.
- LIU, Rong; JIN, J-P. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. *Gene*, v. 585, n. 1, p. 143–153, jul. 2016.
- MACHADO, Flavia R *et al.* The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *The Lancet. Infectious diseases*, v. 17, n. 11, p. 1180–1189, nov. 2017.
- MARTON, Annamaria *et al.* Propylene-glycol aggravates LPS-induced sepsis through production of TNF-alpha and IL-6. *Iranian journal of immunology : IJI*, v. 11, n. 2, p. 113–122, jun. 2014.
- MATARRESE, Paola *et al.* Antioxidants counteract lipopolysaccharide-triggered alterations of human colonic smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine*, v. 53, n. 11, p. 2102–2111, dez. 2012.
- MAZIGHI, Mikael *et al.* IL-10 inhibits vascular smooth muscle cell activation in vitro and in vivo. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 287, n. 2, p. H866-71, ago. 2004.
- MEIER, C R *et al.* Acute respiratory-tract infections and risk of first-time acute myocardial infarction. *Lancet (London, England)*, v. 351, n. 9114, p. 1467–71, 16 maio 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605802>>.
- MENG, Zhe *et al.* Curcumin inhibits LPS-induced inflammation in rat vascular smooth muscle cells in vitro via ROS-relative TLR4-MAPK/NF-kB pathways. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 34, n. 7, p. 901–911, 6 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/aps201324>>.
- MERLE, Nicolas S. *et al.* Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. MAY, p. 1–26, 26 maio 2015. Disponível em: <http://www.frontiersin.org/Molecular_Innate_Immunity/10.3389/fimmu.2015.00257/abstract>.
- MOERER, Onnen *et al.* Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Medicine*, v. 28, n. 10, p. 1440–1446, 1 out. 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00134-002-1429-9>>.
- MOTTERLINI, R *et al.* Depression of endothelial and smooth muscle cell oxygen consumption by endotoxin. *The American journal of physiology*, v. 275, n. 3 Pt 2, p. H776-82, set. 1998.

- NGO, Peter *et al.* Collagen gel contraction assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 341, p. 103–109, 2006.
- NIJLAND, Reindert; HOFLAND, Tom; VAN STRIJP, Jos. Recognition of LPS by TLR4: Potential for Anti-Inflammatory Therapies. *Marine Drugs*, v. 12, n. 7, p. 4260–4273, 23 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/12/7/4260>>.
- NISHIIKE, Satoshi *et al.* Relationship between vascular reactivity and expression of HMGB1 in a rat model of septic aorta. *Journal of Anesthesia*, v. 27, n. 5, p. 684–692, 27 out. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00540-013-1584-x>>.
- NORITOMI, Danilo Teixeira *et al.* Implementation of a multifaceted sepsis education program in an emerging country setting: clinical outcomes and cost-effectiveness in a long-term follow-up study. *Intensive Care Medicine*, v. 40, n. 2, p. 182–191, 22 fev. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00134-013-3131-5>>.
- NUNES, Kenia Pedrosa *et al.* Targeting TLR4 signaling pathways: can therapeutics pay the toll for hypertension? *British journal of pharmacology*, jul. 2018.
- OU, Shuo-Ming *et al.* Long-Term Mortality and Major Adverse Cardiovascular Events in Sepsis Survivors. A Nationwide Population-based Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 194, n. 2, p. 209–217, 15 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201510-2023OC>>.
- OUTZEN, Emilie M *et al.* Lipopolysaccharides, but not Angiotensin II, Induces Direct Pro-Inflammatory Effects in Cultured Mouse Arteries and Human Endothelial and Vascular Smooth Muscle Cells. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 120, n. 4, p. 335–347, abr. 2017.
- OWENS, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological Reviews*, v. 75, n. 3, p. 487–517, jul. 1995. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1995.75.3.487>>.
- OWENS, Gary K; KUMAR, Meena S.; WAMHOFF, Brian R. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews*, v. 84, n. 3, p. 767–801, 1 jul. 2004. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00041.2003>>.
- OYAGBEMI, AdemolaAdetokunbo *et al.* Kolaviron, biflavonoid complex from the seed of *Garcinia kola* attenuated angiotensin II- and lipopolysaccharide-induced vascular smooth muscle cell proliferation and nitric oxide production. *Pharmacognosy Research*, v. 8, n. 5, p. 50, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.phcogres.com/text.asp?2016/8/5/50/178647>>.
- PARK, Beom Seok; LEE, Jie-oh. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 45, n. 12, p. e66–e66, 6 dez. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.97>>.
- PASQUALETTI, Valentina *et al.* Antioxidant activity of inulin and its role in the prevention of human colonic muscle cell impairment induced by lipopolysaccharide mucosal exposure. *PloS one*, v. 9, n. 5, p. e98031, 2014.
- PRESCOTT, Hallie C *et al.* Increased 1-year healthcare use in survivors of severe sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 190, n. 1, p. 62–69, jul. 2014.
- PRESCOTT, Hallie C *et al.* Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 353, p. i2375, maio 2016.
- PRESCOTT, Hallie C; ANGUS, Derek C. Enhancing Recovery From Sepsis: A Review. *JAMA*, v. 319, n. 1, p. 62–75, jan. 2018.
- PRESCOTT, Hallie C; LANGA, Kenneth M; IWASHYNA, Theodore J. Readmission diagnoses after hospitalization for severe sepsis and other acute medical conditions. *JAMA*, v. 313, n. 10, p. 1055–1057, mar. 2015.
- PRICE, Shaun A *et al.* Subacute Sepsis Impairs Vascular Smooth Muscle Contractile Machinery and Alters Vasoconstrictor and Dilator Mechanisms. *Journal of Surgical Research*, v. 83, n. 1, p. 75–80, maio 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480498955688>>.
- QUARTIN, A A *et al.* Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA*, v. 277, n. 13, p. 1058–63, 2 abr. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9091694>>.

- QUINTANO NEIRA, Ricardo Alfredo; HAMACHER, Silvio; JAPIASSU, Andre Miguel. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. *PloS one*, v. 13, n. 4, p. e0195873, 2018.
- QUOILIN, C *et al.* Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1837, n. 10, p. 1790–1800, out. 2014.
- RAETZ, Christian R H; WHITFIELD, Chris. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, v. 71, n. 1, p. 635–700, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>>.
- RAMACHANDRAN, Girish. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. *Virulence*, v. 5, n. 1, p. 213–218, 5 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.27024>>.
- REINHART, Konrad *et al.* New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clinical microbiology reviews*, v. 25, n. 4, p. 609–634, out. 2012.
- RIVARD, A; ANDRÉS, V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. *Histology and histopathology*, v. 15, n. 2, p. 557–71, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10809377>>.
- ROSHAN, Mohsin H K; TAMBO, Amos; PACE, Nikolai P. The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *International journal of inflammation*, v. 2016, p. 1532832, 2016.
- RZUCIDLO, Eva M.; MARTIN, Kathleen A.; POWELL, Richard J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of Vascular Surgery*, v. 45, n. 6, p. A25–A32, jun. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741521407004120>>.
- SADOWITZ, Benjamin *et al.* The Role of Hyaluronic Acid in Atherosclerosis and Intimal Hyperplasia. *Journal of Surgical Research*, v. 173, n. 2, p. e63–e72, abr. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480411007517>>.
- SANDBO, N *et al.* Downregulation of smooth muscle α -actin expression by bacterial lipopolysaccharide. *Cardiovascular Research*, v. 74, n. 2, p. 262–269, 1 maio 2007a. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/j.cardiores.2007.01.011>>.
- SANDBO, Nathan *et al.* Downregulation of smooth muscle alpha-actin expression by bacterial lipopolysaccharide. *Cardiovascular research*, v. 74, n. 2, p. 262–269, maio 2007b.
- SARKAR, R *et al.* Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, v. 78, n. 2, p. 225–30, fev. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8575065>>.
- SAXENA, Ankit *et al.* Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*, v. 74, n. 1, p. 27–34, jul. 2015.
- SCHESCHOWITSCH, Karin *et al.* Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological research*, v. 100, p. 73–84, out. 2015.
- SCHULTE, Wibke; BERNHAGEN, Jürgen; BUCALA, Richard. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators of Inflammation*, v. 2013, p. 1–16, 2013. Disponível em: <<papers3://publication/uuid/58BF094B-59D1-4CC3-A3B6-1B2B116F42F8>>.
- SCIROCCO, Annunziata *et al.* Exposure of Toll-like receptors 4 to bacterial lipopolysaccharide (LPS) impairs human colonic smooth muscle cell function. *Journal of cellular physiology*, v. 223, n. 2, p. 442–450, maio 2010.
- SHAH, Faraaz Ali *et al.* Bidirectional relationship between cognitive function and pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 188, n. 5, p. 586–592, set. 2013.
- SHANKAR-HARI, Manu *et al.* Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 775–787, fev. 2016.
- SHEN, Hsiu-Nien; LU, Chin-Li; YANG, Hsi-Hsing. Epidemiologic Trend of Severe Sepsis in Taiwan

- From 1997 Through 2006. *Chest*, v. 138, n. 2, p. 298–304, ago. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369210604102>>.
- SINGER, Mervyn *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 801, 23 fev. 2016. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.0287>>.
- SOGAYAR, Ana M C *et al.* A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *PharmacoEconomics*, v. 26, n. 5, p. 425–34, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429658>>.
- STEVENSON, Elizabeth K *et al.* Two Decades of Mortality Trends Among Patients With Severe Sepsis. *Critical Care Medicine*, v. 42, n. 3, p. 625–631, mar. 2014. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00003246-201403000-00016>>.
- SUN, Jinghua; DING, Yanchun. NOD2 Agonist Promotes the Production of Inflammatory Cytokines in VSMC in Synergy with TLR2 and TLR4 Agonists. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 1–4, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/607157/>>.
- TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>>.
- TANG, Daolin *et al.* PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, v. 249, n. 1, p. 158–175, set. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>>.
- TANIGUCHI, Leandro U *et al.* Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. *Critical care (London, England)*, v. 18, n. 6, p. 608, nov. 2014.
- TATTOLI, Ivan *et al.* Microbiota, innate immune system, and gastrointestinal muscle: ongoing studies. *Journal of clinical gastroenterology*, v. 46 Suppl, p. S6-11, out. 2012.
- TENNANT, M; MCGEACHIE, J K. Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. *The Australian and New Zealand journal of surgery*, v. 60, n. 10, p. 747–53, out. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2206118>>.
- THOMAS, Roisin C *et al.* Exploring LPS-induced sepsis in rats and mice as a model to study potential protective effects of the nociceptin/orphanin FQ system. *Peptides*, v. 61, p. 56–60, nov. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2014.08.009>>.
- THOMSON, Scott *et al.* Intimal smooth muscle cells are a source but not a sensor of anti-inflammatory CYP450 derived oxylipins. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 463, n. 4, p. 774–780, ago. 2015.
- TRESSEL, Sarah L. *et al.* A matrix metalloprotease-PAR1 system regulates vascular integrity, systemic inflammation and death in sepsis. *EMBO Molecular Medicine*, v. 3, n. 7, p. 370–384, jul. 2011. Disponível em: <<http://embomolmed.embopress.org/cgi/doi/10.1002/emmm.201100145>>.
- VAN DER POLL, Tom *et al.* The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature reviews. Immunology*, v. 17, n. 7, p. 407–420, jul. 2017.
- VEDULA, Sri Ram Krishna *et al.* Collective Cell Migration: A Mechanistic Perspective. *Physiology*, v. 28, n. 6, p. 370–379, nov. 2013. Disponível em: <<http://physiologyonline.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physiol.00033.2013>>.
- VINCENT, Jean-louis. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*, v. 302, n. 21, p. 2323, 2 dez. 2009. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2009.1754>>.
- WANG, Henry E *et al.* Risk of Acute Coronary Heart Disease After Sepsis Hospitalization in the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke (REGARDS) Cohort. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 65, n. 1, p. 29–36, jul. 2017.
- WANG, Kun *et al.* High Mobility Group Box 1 Mediates Interferon- γ -Induced Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 118, n. 3, p. 518–529, mar. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.25682>>.
- WANG, Shaojun *et al.* Tocilizumab inhibits neuronal cell apoptosis and activates STAT3 in cerebral

infarction rat model. *Bosnian journal of basic medical sciences*, v. 16, n. 2, p. 145–150, jan. 2016.

WANG, Zhongbiao; NEWMAN, Walter H. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *The Journal of surgical research*, v. 111, n. 2, p. 261–6, 15 maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850472>>.

WINDER, Steven J.; JESS, Thomas; AYSCOUGH, Kathryn R. SCP1 encodes an actin-bundling protein in yeast. *Biochemical Journal*, v. 375, n. 2, p. 287–295, 15 out. 2003. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj20030796>>.

WORTH, Nathalie F. *et al.* Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, v. 49, n. 3, p. 130–145, jul. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cm.1027>>.

WU, Han *et al.* Emerging Role of High Mobility Group Box-1 in Thrombosis-Related Diseases. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, v. 47, n. 4, p. 1319–1337, jun. 2018.

WURSTER, Samuel H. *et al.* Vascular Smooth Muscle Contractile Function Is Impaired during Early and Late Stages of Sepsis. *Journal of Surgical Research*, v. 56, n. 6, p. 556–561, jun. 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480484710894>>.

YANG, Chih-Jen *et al.* Toona sinensis leaf aqueous extract displays activity against sepsis in both in vitro and in vivo models. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, v. 30, n. 6, p. 279–285, jun. 2014.

YANG, Guoshuai *et al.* Hydroxysafflor yellow A inhibits lipopolysaccharide-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor-4 pathway. *International journal of clinical and experimental medicine*, v. 8, n. 4, p. 5295–302, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26131104>>.

YANG, Hsin-Ling *et al.* Toona sinensis Inhibits LPS-Induced Inflammation and Migration in Vascular Smooth Muscle Cells via Suppression of Reactive Oxygen Species and NF- κ B Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2014, p. 1–16, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/901315/>>.

YANG, Xin *et al.* Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 289, n. 3, p. H1069–H1076, set. 2005. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00143.2005>>.

YANG, Xin *et al.* Toll-like receptor 3 signaling evokes a proinflammatory and proliferative phenotype in human vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 291, n. 5, p. H2334–H2343, nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782847>>.

YAO, Jie *et al.* Lipid A-based affinity biosensor for screening anti-sepsis components from herbs. *Bioscience reports*, v. 34, n. 3, maio 2014.

YENDE, Sachin *et al.* Elevated Hemostasis Markers after Pneumonia Increases One-Year Risk of All-Cause and Cardiovascular Deaths. *PLoS ONE*, v. 6, n. 8, p. e22847, 10 ago. 2011. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022847>>.

YENDE, Sachin *et al.* Risk of Cardiovascular Events in Survivors of Severe Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 189, n. 9, p. 1065–1074, maio 2014. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201307-1321OC>>.

ZEIDAN, Asad *et al.* Ablation of SM22 α decreases contractility and actin contents of mouse vascular smooth muscle. *FEBS letters*, v. 562, n. 1–3, p. 141–146, mar. 2004.

ZHANG, JIANPING *et al.* The influence of genetic polymorphisms in TLR4 and TIRAP, and their expression levels in peripheral blood, on susceptibility to sepsis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 11, n. 1, p. 131–139, 19 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2015.2884>>.

ZHANG, Ming-Jie *et al.* An overview of potential molecular mechanisms involved in VSMC phenotypic modulation. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 145, n. 2, p. 119–130, 26 fev. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00418-015-1386-3>>.

ZURRU, Maria Cristina *et al.* Recent Respiratory Infection Predicts Atherothrombotic Stroke: Case-Control Study in a Buenos Aires Healthcare System. *Stroke*, v. 40, n. 6, p. 1986–1990, 1 jun. 2009. Disponível em: <<http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/STROKEAHA.108.535559>>.

**ANEXO I – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS -
CEUA**



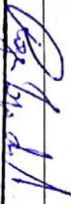
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação fenotípica de células musculares lisas vasculares, provenientes de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos, estimuladas por por LPS", Protocolo nº.67/2016, sob a responsabilidade de Paula Frizera Vassallo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(excepto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino)encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA),e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde- Maruípe-Vitória-ES em 07-04-2017.

| | | |
|---------------------|---------------------------------------|---|
| Vigência do Projeto | Início: Abril/2017 | Término:Abril/2019 |
| Espécie/Linhagem | Ratos Wistar e SHR | |
| Nº de Animais | Experimento Piloto: 8 Wistar e 8 SHRs | Experimental: 40 Wistar 40 SHRs Total: 80 |
| Peso/Idade | Peso: 250 - 300g Idade: 10 semanas | |
| Sexo | Macho | |

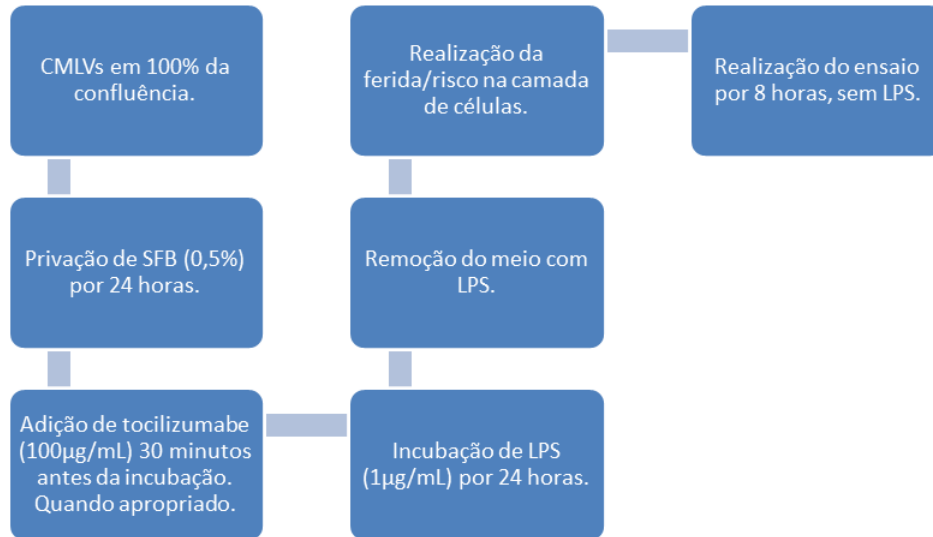
Vitória (ES), 07 de abril de 2017.


Prof. Roger Lyrio dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UFES

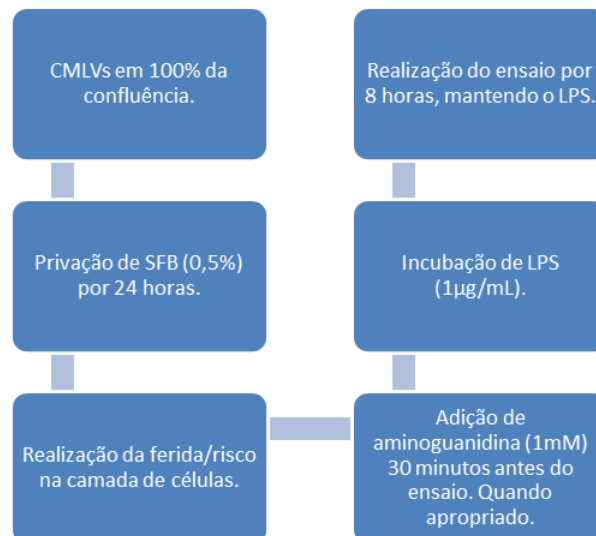
**ANEXO II – FLUXOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS PROTOCOLOS
EXPERIMENTAIS**

MIGRAÇÃO CELULAR

Pré-condicionamento

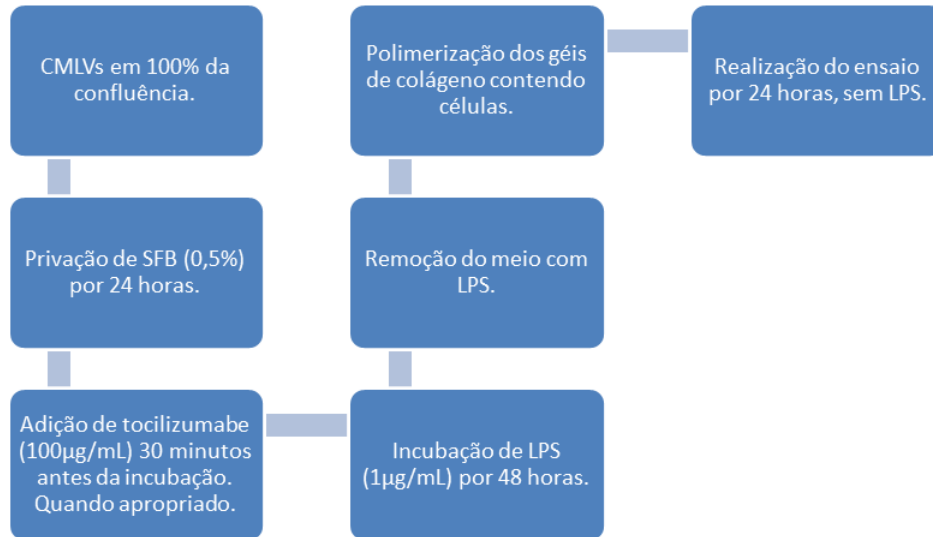


Agudo

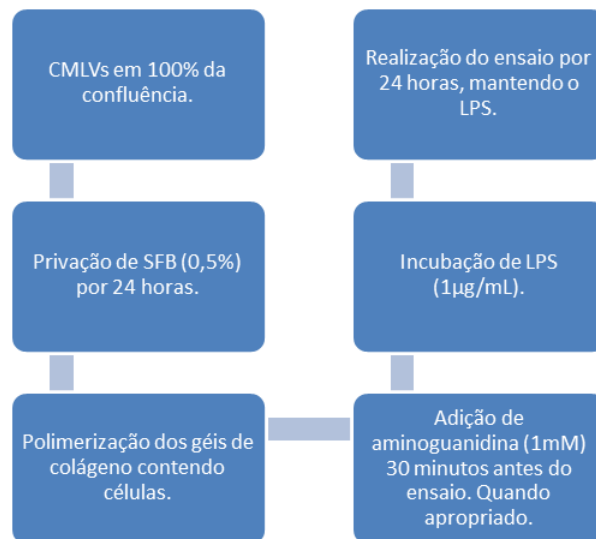


CONTRAÇÃO CELULAR

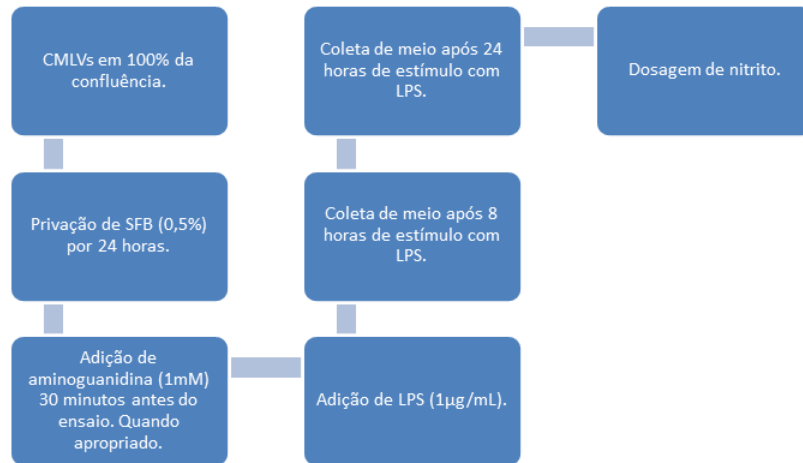
Pré-condicionamento



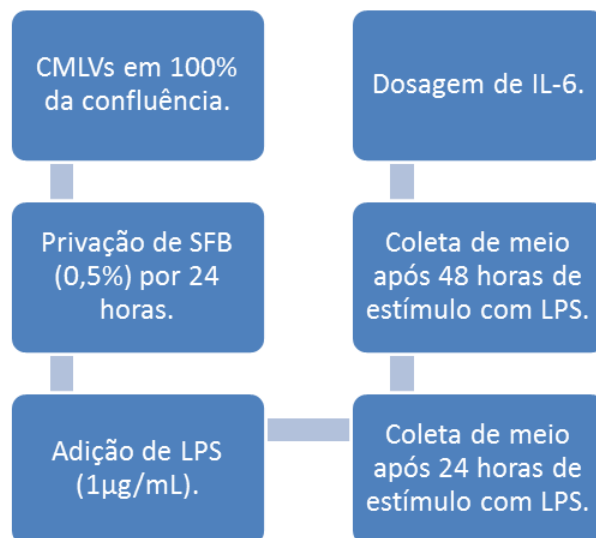
Agudo



PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO



ELISA



RT-PCR